

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: NEBR



Bc. Jan Martinek

Vizualizace a analýza distribuce komplexu ARP2/3 v rostlinách
Visualization and distribution analysis of ARP2/3 complex in plants

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13.8.2015

Podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval všem, kteří se jakýmkoli způsobem podíleli na vzniku této práce, jmenovitě:

- Své školitelce Kateřině Schwarzerové za svědomité vedení mé práce a za mnoho hodin konzultací, které mi ochotně poskytovala kdykoli jsem za ní zašel.
- Honzovi Petráškoví za mnohé inspirativní diskuse a uvedení do tajů spinning disc mikroskopie.
- Lence Sikorové za klonování plasmidů.
- Ondřejovi Šebestovi za pomoc při práci s konfokálním mikroskopem.
- Petru Jírovcovi za média a laboratoř vždy perfektně připravenou k použití.
- Standovi Vosolobě za komplexní podporu, cenné rady k metodice pokusů, experimentálnímu designu a za mnoho skvělých chvil v laboratoři i mimo ni.
- Své přítelkyni Lucii Diblíkové, za to, že nežárlila na tuto práci, které jsem se věnoval v posledním měsíci více než jí, ale naopak mi k ní vařila všemožné vynikající dobroty.
- Vaidurya Pratap Sahi for many interesting and useful discussions and for taking perfect care of my *Arabidopsis* plants while I was abroad.
- Rodičům a prarodičům, kteří mě podporovali, i když jsem jim nebyl schopen úplně přesně vysvětlit, co že to vlastně dělám.
- Bráchovi za zasílání prokrastinačních odkazů.

Dále pak všem členům naší laboratoře děkuji za příjemnou, přátelskou a tvůrčí atmosféru.

Tento projekt byl podpořen Ministerstvem školství mládeže a tělovýchovy České republiky, projekt NPUI No. LO1417

OBSAH

Abstrakt	8
Abstract	9
Seznam zkratek	10
1 Úvod	11
1.1 Cíl práce	11
2 Literární přehled	12
2.1 Cytoskelet	12
2.1.1 Mikrotubulární cytoskelet	12
2.1.2 Aktinový cytoskelet	13
2.1.3 Regulace dynamiky aktinového cytoskeletu	13
2.2 Komplex ARP2/3	14
2.2.1 NPF (Nucleation promoting factors)	17
2.2.2 Rostlinné NPF	18
2.2.3 Regulace komplexu ARP2/3 pomocí SCAR/WAVE	18
2.3 Význam komplexu ARP2/3 u nerostlinných organismů	19
2.3.1 Živočichové	19
2.3.2 Kvasinky	20
2.3.3 Prokaryota a viry	21
2.4 komplex ARP2/3 u rostlin	22
2.4.1 Role komplexu ARP2/3 u rostlin	22
2.5 Lokalizace komplexu ARP2/3 v rostlinách	31
3 Materiál a metody	39
3.1 Použitá media	39
3.2 Kultivace bakterií	40
3.2.1 Izolace plasmidů z <i>Escherichia coli</i>	40
3.2.2 Příprava elektrokompetentních buněk <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	40
3.2.3 Transformace bakterií elektroporací	41
3.2.4 Selektce transformovaných bakterií	41
3.2.5 Udržování bakteriálních linií	41
3.3 Kultivace rostlinného materiálu	42
3.3.1 <i>In vitro</i> kultivace <i>Arabidopsis thaliana</i> a <i>Nicotiana benthamiana</i>	42
3.3.2 Kultivace BY-2	42
3.3.3 <i>Ex vitro</i> kultivace <i>Arabidopsis thaliana</i> a <i>Nicotiana benthamiana</i>	42
3.3.4 Křížení rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
3.4 Transformace rostlinného materiálu	43
3.4.1 Stablní transformace <i>Arabidopsis thaliana</i> metodou Floral dip	43
3.4.2 Transientní transformace <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
3.4.3 Transientní transformace rostlin tabáku infiltrací <i>A. tumefaciens</i> do listů	44

3.5	Příprava protilátek pro imunolokalizaci	45
3.5.1	Expres podjednotek značených HIS-tag	45
3.5.2	Purifikace pomocí HIS-trap	45
3.6	Proteomická analýza	45
3.6.1	Izolace proteinů z rostlinného materiálu	45
3.6.2	Izolace proteinů z bakterií	46
3.6.3	SDS-PAGE	46
3.6.4	Western blot	48
3.6.5	ECL – enhanced chemiluminiscence	48
3.7	Imunolokalizace proteinů v rostlinách	49
3.7.1	Imunolokalizace v kořenech	49
3.7.2	Imunolokalizace v listech	51
4	Výsledky	53
4.1	Vizualizace podjednotek ARP2/3 komplexu pomocí fúze s GFP	53
4.1.1	Transformace komplementuje mutantní fenotyp	53
4.1.2	Lokalizace podjednotek v živých buňkách	54
4.1.3	Kolokalizace s cytoskeletem	57
4.1.4	Kolokalizace s dalšími organelami	61
4.2	Vizualizace podjednotek ARP2/3 komplexu pomocí protilátek	65
4.2.1	Příprava vlastních protilátek	67
5	Diskuse	72
5.1	Vizualizace podjednotek komplexu ARP2/3 pomocí fúze s GFP	72
5.1.1	Jaderná lokalizace podjednotek komplexu ARP2/3	72
5.1.2	Lokalizace podjednotek komplexu ARP2/3 do arposomů	73
5.1.3	Jsou arposomy pouze arteficiální shluky overexprimovaného proteinu?	74
5.1.4	Vztah arposomů a aktinového cytoskeletu	75
5.1.5	Vztah arposomů a mikrotubulárního cytoskeletu	76
5.1.6	Interakce arposomů a peroxisomů	76
5.2	Funkce arposomu	77
5.2.1	Ovlivňuje arposom pohyblivost peroxisomu?	78
5.2.2	Hraje arposom roli v dělení peroxisomu?	78
5.2.3	Hraje arposom roli v degradaci peroxisomu?	79
5.3	Vizualizace podjednotek komplexu ARP2/3 pomocí protilátek	81
6	Souhrn	82
7	Literatura	83

Abstrakt

Aktinový cytoskelet je velmi dynamická struktura, která podléhá neustálé přestavbě polymerací, depolymerací, stříháním, svazkováním a větvením. Jedním z faktorů řídících polymeraci aktinu je ARP2/3, heteroheptamerický proteinový komplex evolučně konzervovaný takřka u všech eukaryotických organismů. Podjednotky ARP2 a ARP3 se strukturou podobají monomeru aktinu a tvoří v rámci komplexu nukleární centrum pro polymeraci nových aktinových vláken. Komplex je navíc schopen nasedat na již existující mikrofilamenta a vytvářet nové větve pod úhlem cca. 70 °. V živočišných buňkách hraje komplex ARP2/3 klíčovou roli v buněčné motilitě skrze tvorbu lamellipodií a jeho mutace jsou obvykle letální. U rostlin mají mutanti pouze mírné fenotypové projevy na úrovni buněčné morfologie, jako jsou deformované trichomy nebo méně laločnaté pokožkové buňky. Abychom objasnili funkci komplexu ARP2/3 v rostlinách, rozhodli jsme se jej vizualizovat *in vivo* v diferencovaných buňkách *Arabidopsis thaliana* pomocí translační fúze jednotlivých podjednotek s GFP. Fúzní proteiny GFP-AtARPC2 a GFP-AtARPC5 po transformaci do mutantů postrádajících odpovídající podjednotku komplexu komplementovaly mutaci a zachránily deformovaný fenotyp trichomů. Oba fúzní proteiny vykazovaly stejnou difusní lokalizaci v cytoplasmě, v jádře a v tečkovitých motilních strukturách, které jsme pracovníčně nazvali arposomy. Kolokalizační studie ukázala, že arposomy se pohybují podél aktinového cytoskeletu a jsou exklusivně asociované se subpopulací peroxisomů. Podstata arposomu ani jeho funkce není známa, ale je možné, že hraje roli v pohyblivosti, biogenezi, dělení nebo degradaci peroxisomů.

Abstract

Actin cytoskeleton is highly dynamic structure, constantly remodelled by processes of polymerization, depolymerization, bundling, cutting and branching. One of the factors which control the polymerization of actin is ARP2/3, heteroheptameric protein complex evolutionary conserved in almost all eukaryotes. Subunits ARP2 and ARP3 are structurally similar to actin monomers and forms nucleation core for new actin filament formation within the complex. ARP2/3 can also bind to already existing actin filament and form a new branch at the angle of 70 °. In animal cells, ARP2/3 complex is crucial for cell motility through formation of lamellipodia and mutations in its subunits are usually lethal. In plants, only mild changes in trichomes and epidermal cells shape were observed. ARP2/3 complex is thus considered to play a role in plant cell morphogenesis through modulation of actin cytoskeleton. Despite the long-term research on plant ARP2/3 complex, only sparse information is available about its localization in plant cells. To understand the role of ARP2/3 complex in plant cells, we have transformed both wild type *Arabidopsis thaliana* plants and mutant plants lacking subunits of the complex with GFP-fused subunits. GFP-ARPC2 and GFP-ARPC5 fusion proteins complemented the distorted trichomes phenotype of respective mutant background. Both fusion proteins were localized into the cytoplasm and nucleus and formed similar motile dot-like structures which we called arposomes. Co-localisation of arposomes with other organelles revealed that they moved along actin filaments and were exclusively associated with a subpopulation of peroxisomes. The nature and function of arposome remains to be elucidated, its possible role in peroxisomal motility, biogenesis, fission or degradation is discussed.

Seznam zkratek

ABP	actin binding protein
ASB	actin stabilising buffer
AP	ammonium persulfate
ARP	actin related protein
ARPC1-5	actin related protein 2/3 complex subunit 1-5
ASB	actin stabilising buffer
BCHA1	Beach-Domain Homolog A1
BSA	bovine serum albumin
BY-2	bright yellow 2
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EGTA	ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
GTP	guanosintrifosfát
HSP300	hematopoietic stem progenitor clone 300
HRP	horseradish peroxidase
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	Lysogeny broth
MBS	m-maleimidobenzoyl N-hydroxysuccinimide ester
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MS	Murashige and Skoog basal salt mixture
NPF	nucleation promoting factor
OD ₆₀₀	Optical density (λ = 600nm)
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
PIPES	piperazine-N,N'-bis(ethanesulfonic acid)
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	polyvinylidendifluorid
P _i	fosfátový zbytek
ROP	RHO of plants
Rpm	rounds per minute
SCAR	suppressor of cAMP receptor
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate – polyacrilamide gel electrophoresis
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine
TGN	Trans-Golgi Network
VCA	verprolin homology connecting acidic domain
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAV	Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous
YEB	Yeast Extract Broth

1 Úvod

Aktinový cytoskelet vytváří v buňkách dynamickou síť, která se neustále dynamicky přeskupuje působením procesů polymerace, depolymerace, svazkování, stříhání a větvení. Jedním z faktorů ovlivňujících polymeraci aktinového cytoskeletu u rostlin je ARP2/3, heteroheptamerický proteinový komplex, který je schopen nukleovat polymeraci aktinových filament *de novo* nebo vytvářet větvení z již existujících vláken pod úhlem cca 70 ° (Amann and Pollard, 2001; Rouiller et al., 2008).

Polymerace aktinových filament řízená komplexem ARP2/3 u živočichů zajišťuje tvorbu lamellipodií a je tudíž nezbytná pro buněčný pohyb. Není proto překvapivé, že mutace v podjednotkách komplexu ARP2/3 jsou u živočichů letální (Vartiainen and Machesky, 2004). U rostlin se mutace projevují pouze mírně, typické fenotypové změny u mutantů *Arabidopsis thaliana* zahrnují deformované (distorted) trichomy, méně laločnaté pokožkové buňky a zvládně kořenové vlásky (Mathur et al., 2003a, 2003b). Z těchto projevů lze vyvodit, že ARP2/3 komplex u rostlin hraje roli v buněčné morfogenezi.

Dosud publikované práce sledovaly lokalizaci podjednotek komplexu ARP2/3 ve fixovaném materiálu pomocí protilátek (Zhang et al., 2013; Van Gestel et al., 2003), nebo v izolovaných buňkách tabákové suspenze BY-2 (Maisch et al., 2009). Tato práce si klade za cíl vizualizovat podjednotky komplexu ARP2/3 v živých diferencovaných buňkách v kontextu rostlinného těla.

1.1 Cíl práce

- Vizualizovat všechny podjednotky komplexu ARP2/3 v živých rostlinných buňkách *Arabidopsis thaliana* pomocí fúze s fluorescenčním proteinem. Funkčnost fúzního proteinu ověřit komplementací mutantního fenotypu u rostlin postrádajících odpovídající podjednotku.
- Lokalizovat značené podjednotky v různých typech buněk, porovnat distribuci různých podjednotek v buňkách, kolokalizovat komplex ARP2/3 s cytoskeletem případně dalšími organelami.
- Z pozorované lokalizace komplexu a jeho asociace s cytoskeletem, případně s dalšími organelami se pokusit vyvodit možnou funkci komplexu v rostlinné buňce.

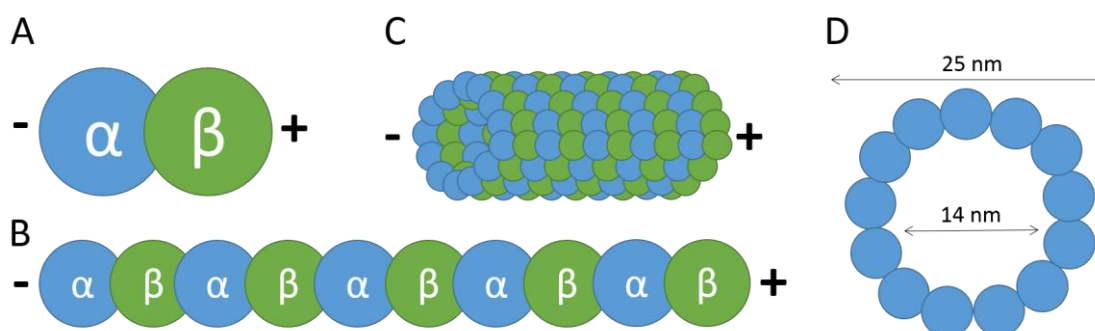
2 Literární přehled

2.1 Cytoskelet

Cytoskelet je dynamická síť složená z vláknitých proteinových struktur, která slouží jako buněčná kostra a infrastruktura. Typicky se skládá ze dvou složek – aktinových vláken (mikrofilament), a mikrotubulů. Některé skupiny organismů navíc obsahují ještě intermediální filamenta. Rostlinný cytoskelet se skládá z aktinových mikrofilament a z mikrotubulů, intermediální filamenta u nich nebyla spolehlivě potvrzena. Cytoskelet je zodpovědný za polarizaci buňky a její orientaci v rámci tkáně či pletiva, umístění a pohyb organel v rámci buňky, vakuový transport, endocytosu a exocytosu a přenos mechanických signálů. U živočichů hraje roli v buněčném pohybu, a dodává buňkám mechanickou pevnost. U rostlin zajišťuje mechanickou odolnost buněk rigidní buněčná stěna. Regulací deposice komponent buněčné stěny cytoskelet řídí růst a tvarování rostlinných buněk.

2.1.1 Mikrotubulární cytoskelet

Mikrotubulární cytoskelet je složen z heterodimerů alfa a beta tubulinu, což jsou globulární proteiny schopné po navázání GTP polymerovat do vláknitých struktur - protofilament. Zatímco α -tubulin své GTP nemůže štěpit, β -tubulin má GTPázovou aktivitu a po zařazení do mikrotubulu po nějaké době štěpí navázané GTP na GDP (Amos, 2004). Dimery s navázaným GTP mají tendenci polymerovat na plus konci, zatímco minus konec, kde už většina dimerů hydrolyzovala své GTP, má tendenci k depolymeraci. Z laterálně uspořádaných protofilament se skládají válcovité mikrotubuly s vnějším průměrem 25 nm a vnitřní dutinou o průměru 14 nm (Obrázek 1). Mikrotubuly na plus konci neustále polymerují a depolymerují. Dimery s navázaným GTP se přidávají na plus konec a tím dochází k růstu vlákna, zároveň se tím vytváří GTP čepička, která brání rozpadu. Pokud konec přestane přirůstat, β -tubulin v čepičce hydrolyzuje GTP na GDP a dochází k rozpadu mikrotubulu označovanému jako katastrofa (Amos, 2004). Na rozpadajícím se mikrotubulu se může růst znovu obnovit, což se označuje jako záchrana. Trojrozměrná síť mikrotubulů je důležitá pro kotvení a pohyb některých organel v rámci buňky prostřednictvím molekulárních motorů kinesinů. Rostlinné kinesiny se na rozdíl od většiny živočišných mohou pohybovat k plus i minus konci mikrotubulů (Lee and Liu, 2004). Kortikální mikrotubuly svým uspořádáním ovlivňují vzor uspořádání celulosových mikrofibril a tak regulují směr růstu buněk (Bringmann et al., 2012). Mikrotubulární cytoskelet je také nezbytný pro buněčné dělení, neboť vytváří dělicí vřetenko zodpovědné za rozchod chromosomů do dceřiných buněk a fragmoplast zodpovědný za tvorbu nové mezibuněčné přepážky (de Keijzer et al., 2014).



Obrázek 1: Struktura mikrotubulů. Heterodimer složený alfa a beta tubulinu (A), protofilamentum složené z heterodimerů (B), mikrotubulus složený z protofilament (C), schematický průřez mikrotubulem (D).

2.1.2 Aktinový cytoskelet

Aktinový cytoskelet se skládá z mikrofilament, proteinových vláken o průměru cca 7 nm, která polymerují z monomerů aktinu. Aktin je globulární protein s molekulovou hmotností 42 kDa. V buňce se nachází ve dvou stavech - v podobě volných monomerů se označuje jako G-aktin (globular actin) a polymerovaný do vláken jako F-aktin (filamentous actin) (Pollard and Borisy, 2003). Na rozdíl od živočichů a kvasinek, kteří mají většinu aktinu ve formě vláken, najdeme u rostlin v buňce převahu G-aktinu, v některých případech tvoří vlákna pouhých 2% celkového aktinového poolu (Staiger and Blanchoin, 2006). Stejně jako mikrotubuly jsou i aktinová filamenta polarizovaná a rozlišujeme u nich plus a minus konec (dříve označované také jako *barbed* a *pointed end*, podle šípovitého vzoru polarizovaně navázaných myosinů pozorovatelného na fotografiích z elektronového mikroskopu). Na plus konci dochází k přidávání dalších monomerů a tím k jeho prodlužování, minus konec depolymeruje, což je způsobeno ATPázovou aktivitou aktinových monomerů. Ty mají ve struktuře své molekuly kapsu, do které se váže ATP, což aktivuje molekulu k polymeraci. Po navázání dochází velmi záhy k rozštěpení ATP na ADP + P_i, fosfát však nedisociuje a vlákno se stále udržuje stabilní. Teprve po disociaci fosfátové molekuly dochází k destabilizaci filamenta a jeho depolymeraci (Straub and Feuer, 1950; Pollard and Borisy, 2003). Proto je plus konec, na kterém přibývají nové podjednotky stabilní, zatímco minus konec, kde se hromadí podjednotky s ADP je nestabilní a dochází na něm k depolymeraci. V případě že je rychlost polymerace a depolymerace vyrovnaná, dochází k jevu označovanému jako *treadmilling*, kdy si vlákno zachovává stále přibližně stejnou délku i když na jednom konci stále přirůstá a na druhém se rozpadá.

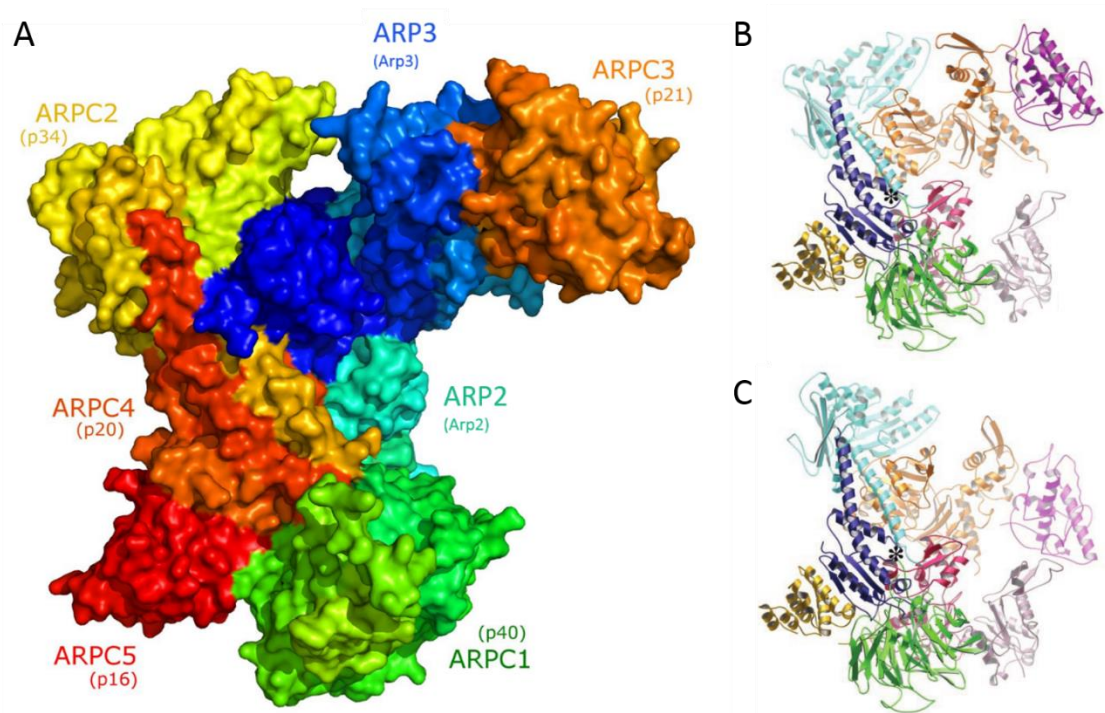
2.1.3 Regulace dynamiky aktinového cytoskeletu

Dynamiku aktinového cytoskeletu ovlivňuje celá řada proteinů a proteinových komplexů, které s ním různým způsobem interagují. Profilin váže monomery aktinu a katalyzuje výměnu

ADP za ATP, čímž umožňuje jejich zapojení do polymerace. Fimbrin svazkuje vlákna do silnějších kabelů, capping protein zastavuje polymeraci plus konce a stabilizuje vzniklé vlákno, co-filin seká mikrofilamenta a tím podporuje depolymeraci (Winder and Ayscough, 2005). Po aktinových filamentech se za spotřeby ATP pohybují myosinové motory, které v rámci buňky zajišťují transport váčků a membránových organel jako jsou peroxisomy, dictiosomy Golgiho aparátu nebo mitochondrie (Sparkes, 2010; Avisar et al., 2008) a jsou tak zodpovědné za míchání cytoplazmy známé jako cytoplasmatické proudění (Shimmen and Yokota, 2004). Při dostatečně vysoké koncentraci je aktin *in vitro* schopen polymerovat spontánně. Není to ale příliš efektivní, protože k odstartování polymerace jsou třeba dimery či trimery aktinu, které nejsou stabilní. Pokud však již vzniknou, následuje rychlá elongace nového filamenta. V živých buňkách je spontánní polymerace aktinu i přes jeho vysokou koncentraci zanedbatelná a poměr mezi rozpuštěným G-aktinem a polymerovaným F-aktinem je důsledně regulován. Brání jí například profilin nebo capping protein (CP) (Hussey et al., 2006). Nukleaci polymerace naopak zajišťují specifické proteiny a proteinové komplexy označované jako nukleační či elongační faktory. U rostlin byly dosud objeveny pouze forminy a ARP2/3 komplex (Pollard, 2007). Forminy jsou proteiny schopné asociovat s plus koncem rostoucího aktinového filamenta a podporovat jeho elongaci přidáváním dalších monomerů, čímž vznikají rovná vlákna (Zigmond, 2004). Komplex ARP2/3 nasedá na již existující vlákna a odsud iniciuje polymeraci jako nukleační počátek – na rozdíl od forminů zůstává na minus konci filamenta. Tímto způsobem vytváří větvení aktinové sítě (Mullins et al., 1998; Amann and Pollard, 2001).

2.2 Komplex ARP2/3

ARP2/3 je proteinový komplex o velikosti asi 220 kDa, složený ze sedmi podjednotek. Dvě podjednotky - ARP2 a ARP3 - které daly komplexu jméno, patří do rodiny ARP (actin related protein). Heteroheptamer tvoří s pěti dalšími nepříbuznými podjednotkami, podle hmotnosti pojmenovanými od největší po nejmenší - ARPC1, ARPC2, ARPC3, ARPC4, ARPC5 (Obrázek 2). V literatuře se můžeme setkat s různým označením stejných podjednotek, podle toho, v jakém organismu byly studovány. U člověka, ostatních obratlovců, kvasinek i měňavek se pro proteiny ekvivalentní rostlinným podjednotkám ARPC1-5 (Li et al., 2003) používají názvy odvozené od jejich molekulové hmotnosti (Tabulka 1). U rostlin se navíc používají označení vycházející z původně popsanych mutantů skupiny *distorted* (Hülkamp et al., 1994). V této práci bude pro přehlednost použito základní rostlinné názvosloví (ARPC1-ARPC5) bez ohledu na zmiňovaný organismus.



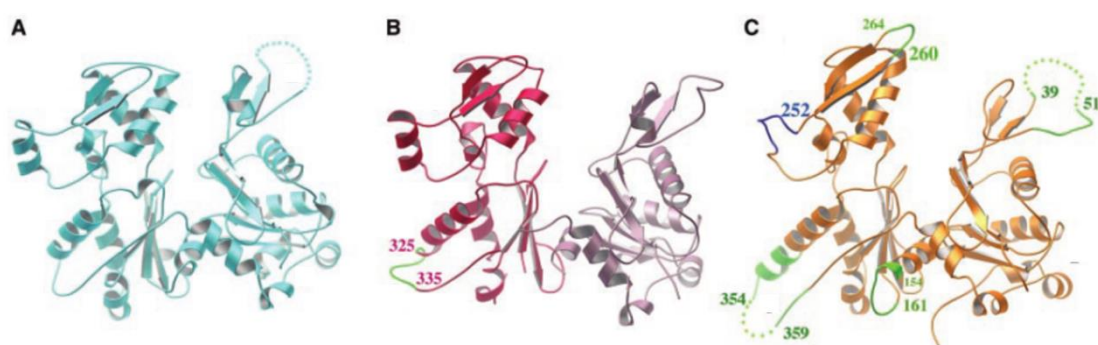
Obrázek 2: Struktura proteinového komplexu ARP2/3. Model terciární konformace podle krystalové struktury hovězího ARP2/3 komplexu č. 1K8K z databáze Protein Data Bank (A). V závorkách jsou uvedena živočišná označení podjednotek. Renderováno v programu Pymol (Delano, 2002). Komplex je neaktivní (B) dokud ho faktory podporující nukleaci (NPF) neaktivují, což se projeví změnou konformace (C) kdy se podjednotky ARP2 a ARP3 přiblíží k sobě a vytvoří strukturu připomínající aktinový dimer (Robinson et al., 2001).

Tabulka 1: Označení ekvivalentních podjednotek u různých taxonomických skupin organismů. *Acanthamoeba castellanii*, člověk a kvasinky *S. pombe* a *S. cerevisiae* dle Machesky and Gould (1999), obratlovci dle Pollard (2002) háďátka *C. elegans* dle Sawa (2003), rostliny dle (Li et al., 2003) pojmenování podjednotek u *Dictyostelia* odpovídá pojmenování u člověka (Machesky and Gould, 1999). Některé podjednotky byly u rostlin původně pojmenovány podle mutací skupiny *distorted* (Hülskamp et al., 1994).

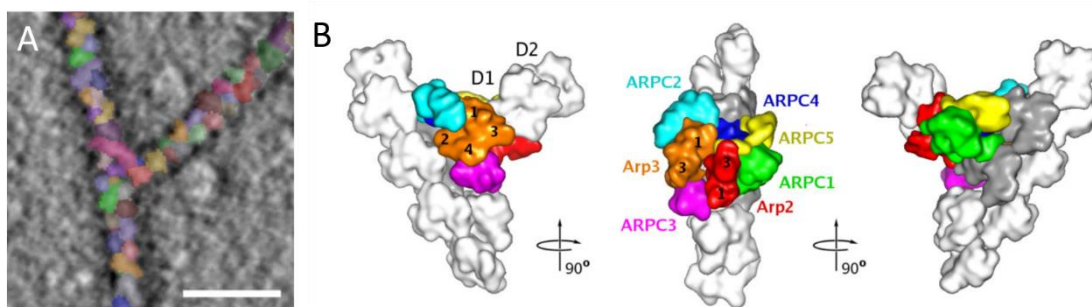
<i>H. sapiens</i>	Obratlovci	<i>C. elegans</i>	kvasinky	<i>A. castellanii</i>	Rostliny/mutanti
Arp2	Arp2	Arx2	Arp2p	Arp2	ARP2/ <i>wurm</i>
Arp3	Arp3	Arx1	Arp3p	Arp3	ARP3/ <i>distorted1</i>
pP41-Arc	p41	Arx3	Arc40p, Sop2	p40	ARPC1
p34-Arc	p34	Arx4	Arc35p	p35	ARPC2/ <i>distorted2</i>
p21-Arc	p21	Arx5	Arc18p	p18	ARPC3
p20-Arc	p20	Arx6	Arc19p	p19	ARPC4
p16-Arc	p16	Arx7	Arc15p	p14	ARPC5/ <i>crooked</i>

Podjednotky ARP2 a ARP3 jsou proteiny strukturně podobné monomeru aktinu (Obrázek 3), nachází se v centru komplexu a fungují jako nukleační centrum pro polymeraci nových aktinových vláken. O podobnosti těchto podjednotek s aktinem svědčí i to, že jsou schopné vázat profilin, protein asociovaný s monomerním aktinem, který sekvstruje aktinové monomery a brání spontánní nukleaci - díky afinitě k profilinu byl také komplex ARP2/3 poprvé izolován z měňavky *Acanthamoeba castellanii* (Machesky et al., 1994) a v prvních pracích se označoval

jako profilin-binding complex (Kelleher, 1995). V základním stavu je ale komplex nefunkční a aktivuje se až působením faktorů podporujících nukleaci (NPF, nucleation promoting factors), které změni jeho konformaci tak, že se podjednotky ARP2 a ARP3 přiblíží k sobě a tak vytvoří strukturu podobnou aktinovému dimeru na plus konci aktinového vlákna. Ten pak slouží jako očko, na kterém může docházet k připojování aktinových monomerů a růstu filamenta (Robinson et al., 2001). Tento mechanismus potvrzuje inhibitor komplexu ARP2/3, indolový derivát označovaný jako CK-666, který je schopen bránit pohybu podjednotek ARP2 a ARP3 k sobě, a tím stabilizuje komplex v inaktivní formě (Hetrick et al., 2013). Podjednotky ARPC1, ARPC2, ARPC3, ARPC4 a ARPC5 vytváří platformu umožňující nasedání komplexu na již existující vlákno, díky čemuž komplex ARP2/3 hraje roli nejen v nukleaci ale i větvení aktinové sítě (Obrázek 4). Úhel odvětvení je 70-80 ° (Amann and Pollard, 2001; Rouiller et al., 2008). Pro integritu komplexu jsou důležité hlavně podjednotky ARPC4 a ARPC2, které spolu vytváří dimerní jádro, kolem kterého se zbytek komplexu skládá (Kotchoni et al., 2009). Komplex je silně evolučně konzervován, najdeme ho téměř u všech eukaryotických organismů, k sekundární ztrátě komplexu došlo u některých jednobuněčných organismů, jako je diplomonáda *Giardia lamblia*, či původce malárie *Plasmodium falciparum*. V rámci rostlinné linie ztratily komplex ARP2/3 některé z jednobuněčných řas jako je *Chlorella* a *Micromonas* (Kollmar et al., 2012). Podjednotky komplexu jsou evolučně značně konzervované, a to dokonce tak, že jsou funkční i při přenosu mezi organismy, např. ARP3 z *Arabidopsis thaliana* je schopna komplementovat ztrátovou mutaci této podjednotky v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* (Le et al., 2003), lidská podjednotka ARPC5 dokáže komplementovat fenotyp mutantu *arpc5* u *Arabidopsis thaliana* (Mathur et al., 2003b).



Obrázek 3: Strukturní podobnost aktinu a podjednotek ARP2 a ARP3. struktura molekuly králičího svalového aktinu (A), hovězí podjednotka ARP2 (B) a hovězí podjednotka ARP3 (C) (upraveno dle Robinson et al., 2001). Tyto dvě podjednotky v komplexu napodobují aktinový dimer a slouží jako očko k nukleaci polymerace aktinového vlákna.



Obrázek 4: Větvění aktinových filament pomocí komplexu ARP2/3. A: Kolorovaná fotografie z elektronového mikroskopu zachycuje větvění aktinového cytoskeletu měňavky *Acanthamoeba castellanii* (měřítko = 20 nm). B: model nasedání komplexu na mateřské vlákno a odvětvení dceřiného vlákna založený na elektronové tomografii 279 individuálních větvění. D1 a D2 označuje první dva monomery aktinu tvořící dceřiné vlákno (upraveno dle Rouiller et al., 2008).

2.2.1 NPF (Nucleation promoting factors)

Pro plnou nukleační funkci komplexu ARP2/3 je nutná jeho aktivace proteiny označovanými jako faktory podporující nukleaci (nucleation promoting factors, NPF). Hlavními NPF jsou proteiny z rodiny WASP. Faktor WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) byl objeven jako mutant projevující se poruchami krvetvorby a imunitního systému - jedná se o NPF specificky exprimovaný v hematopoetických buňkách (Zicha et al., 1998). Dalšími členy rodiny jsou obratlovci N-WASP (neuronal WASP) a na základě homologie s WASP objevený WAVE (WASP family verprolin-homologous protein). Nezávisle na tom byl WAVE objeven v *Dictyostelium discoideum* a popsán jako SCAR (Bear et al., 1998). Proto se někdy používá označení SCAR/WAVE (Pollitt and Insall, 2009). V posledních letech byly identifikovány další NPF jako WASH (WASP and SCAR homolog), WHAMM (WASP homolog associated with actin, membranes and microtubules) a JMY (junction-mediating and regulatory protein), což je protein homologický WHAMM, dále pak WAWH (WASP without WH1 domain) a WAML (WASP and MIM like) (Kollmar et al., 2012). Nezbytnost NPF pro aktivaci komplexu ARP2/3 dokazují projevy, kterými se vyznačují někteří mutanti, například již výše zmíněný Wiskott-Aldrichův syndrom, ale i pokusy na izolovaných buňkách. V kultivovaných buňkách octomilky (*Drosophila melanogaster*) vede RNA interference faktoru SCAR/WAVE a některých proteinů, které jsou s ním v komplexu, k problémům ve vytváření lamellipodiálních výběžků membrány (Kunda et al., 2003). Další pokusy ukazují aktivaci komplexu ARP2/3 *in vitro*. Nejen, že purifikovaný faktor WASP indukuje polymeraci aktinu v buněčném extraktu, ale dokonce se ukázalo, že mikroskopické kuličky (průměr 1 μm) s navázaným faktorem WASP vytváří v buněčném extraktu aktinové komety a pohybují se podobně jako některé vnitrobuněčné patogeny (viz Význam

komplexu ARP2/3 u nerostlinných organismů). Fakt, že WASP polymeruje aktin skrze aktivaci komplexu ARP2/3 je dokázán tím, že po imunodepleci komplexu ARP2/3 z extraktu se pohyb kuliček zastavil, a po jeho přidání opět obnovil (Yarar et al., 1999).

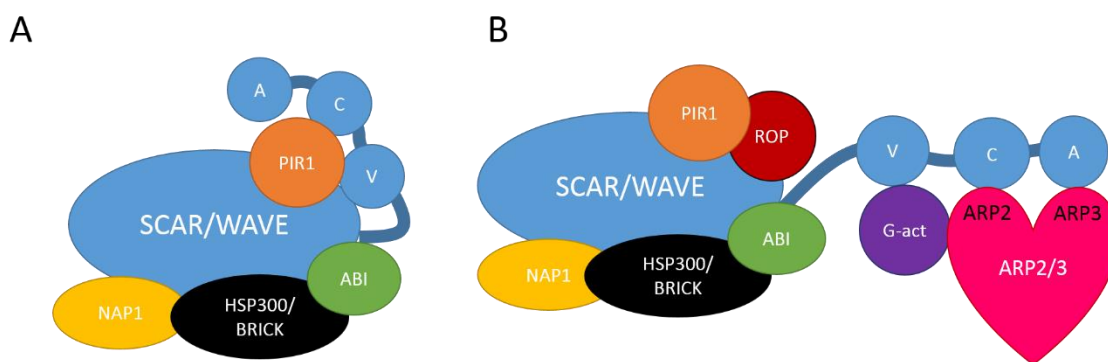
2.2.2 Rostlinné NPF

Společný předek všech eukaryotických organismů měl podle fylogenetické analýzy v genomu homology faktorů WASP, WAVE a WASH. V rostlinné linii došlo k úplné ztrátě faktoru WASP. U bazálních rostlin jako jsou mechy (*Physcomitrella patens*) nebo vranečky (*Selaginella moellendorfi*) můžeme ještě najít homolog faktoru WASH. Ten byl na základě EST sekvencí nalezen ještě u rodu *Picea*. U některých rostlin ze skupiny liliopsida se našly fragmenty N-terminální domény proteinu WASH, pravděpodobně se jedná o rozpadající se pseudogeny. U Kryptosemenných rostlin tak zůstává jako jediný nukleaci podporující faktor WAVE, u rostlin označovaný tradičně jako SCAR, případně SCAR/WAVE (Kollmar et al., 2012). Z toho, že mutanti v komplexu SCAR/WAVE mají podobné fenotypy deformovaných trichomů a podobné defekty uspořádání aktinového cytoskeletu v buňkách jako mutanti v podjednotkách komplexu ARP2/3 lze usuzovat, že i rostlinný komplex SCAR/WAVE funguje jako aktivátor komplexu ARP2/3 (Basu et al., 2005; Le et al., 2006; El-Assal et al., 2004; Basu et al., 2004). Některé práce naznačují, že by v rostlinách mohly existovat i jiné NPF – například genom váleče *Volvox carterii* obsahuje geny pro podjednotky komplexu ARP2/3, ale ani jeden ze známých NPF (Kollmar et al., 2012).

2.2.3 Regulace komplexu ARP2/3 pomocí SCAR/WAVE

Rostlinná aktivace komplexu ARP2/3 je ve srovnání s živočišnou velmi jednoduchá, zahrnuje pouze jeden NPF, SCAR/WAVE, který je aktivován GTPázou z rodiny ROP (Rho of plants) (Hussey et al., 2006). Rostliny obsahují 4 homology genu SCAR/WAVE označované jako SCAR1-4 (Zhang et al., 2008). SCAR/WAVE má stejně jako všechny ostatní NPF z rodiny WASP takzvanou VCA doménu (Obrázek 5). Ta je velmi konzervovaná a skládá se ze tří domén, které jí dávají jméno, tedy V, C a A. V znamená Verprolin homology domain, také je označována jako WH2, C označuje Cofilin homology domain, případně ADF homology domain (ADF-H) nebo též Central domain a A značí Acidic domain. VCA doména je nezbytná pro aktivaci komplexu ARP2/3, protože svou CA částí se váže na podjednotky ARP2 a ARP3 a spolu s navázaným ATP indukuje konformační změnu vedoucí k jejich přiblížení. Spolu s doménou V, která váže monomer G-aktinu tak spouští nukleaci nového aktinového vlákna. Afinitu VCA domény ke komplexu ARP2/3 dokazuje například fakt, že zvýšená exprese VCA domény v živočišných buňkách způsobuje sekvestraci ARP2/3 komplexu a tím jeho inhibici, což se projevuje sníženou tvorbou pseudopodií (Komano et al., 2004). SCAR/WAVE proteiny jsou v buňkách inaktivní jako součást SCAR/WAVE komplexu (také nazývaného jako S/WRC – SCAR/WAVE regulatory

complex). Ten se skládá z pěti proteinů – samotného SCAR/WAVE, SRA1 (u rostlin PIR1), ABI, NAP1 a HSP300 (BRICK). VCA doména je svou V částí asociována se SRA1, což vede k inhibici její funkce a tudíž k inaktivaci komplexu. O aktivaci komplexu rozhoduje malá GTPáza RAC1 (u rostlin ROP), která se váže na SCAR/WAVE komplex tak, že znemožňuje vazbu mezi SRA1 (u rostlin PIR1) a VCA doménou SCAR/WAVE proteinu (Obrázek 5). Tím se VCA doména uvolňuje a může aktivovat komplex ARP2/3 (Rotty et al., 2013). Rostlinné SCAR/WAVE se od živočišných liší například absencí domény PPR (poly-prolin region) a přítomností specifických motivů označovaných jako WAM1-4 (WAVE motif) (Kollmar et al., 2012), funkce NPF a jejich dráha aktivace komplexu ARP2/3 je ale natolik důležitá, že je konzervovaná napříč eukaryotickými organismy a rostlinný SCAR/WAVE z *Arabidopsis thaliana* je schopen aktivovat hovězí komplex ARP2/3 (Basu et al., 2005). Také exprese lidského SRA1 dokáže komplementovat fenotyp rostlin s mutací v PIR1 (což je homolog živočišného SRA1) v *Arabidopsis thaliana* (Basu et al., 2004)



Obrázek 5: SCAR/WAVE je v inaktivovaném stavu způsobeném vazbou V části VCA domény na PIR1 (SRA1), čímž dochází k inaktivaci komplexu (A). V případě signalizace k aktivaci nasedá GTPáza ROP (Rho of plants) na komplex SCAR/WAVE a kompetitivně vytěsňuje vazbu mezi PIR1 (SRA1) a VCA doménou SCAR/WAVE proteinu. Ta se uvolňuje do prostoru a může se svou CA částí vázat na podjednotky ARP2 a ARP3 komplexu ARP2/3. spolu s částí V, která navazuje monomer G-aktinu pak VCA doména aktivuje ARP2/3 komplex a dochází k nukleaci polymerace (Rotty et al., 2013).

2.3 Význam komplexu ARP2/3 u nerostlinných organismů

2.3.1 Živočichové

Polymerace aktinu je nezbytná pro motilitu a změny tvaru živočišných buněk. Jejich plazivý pohyb je typicky složen ze čtyř kroků. Nejprve se na čelním okraji vytváří výběžky cytoplasmatické membrány (lamellipodia), které se přichytí na substrátu, následně se za nimi pohybuje zbytek buněčného objemu a nakonec dochází k odpoutání od substrátu. Tvorba lamellipodií je podmíněna právě polymerací aktinových filament pomocí komplexu ARP2/3 na

okraji buňky (Pollard and Borisy, 2003) (Obrázek 6, A-C). Směřovaný pohyb v rámci gradientu atraktantu je nezbytný pro chemotaxi u jednobuněčných organismů jako jsou měňavky (Machesky et al., 1994), v rámci mnohobuněčného organismu je nezbytný pro migraci buněk v průběhu embryogeneze. Zatímco kmenové buňky jsou typicky statické, diferencované buňky na své konečné místo často migrují, což je nezbytné pro zdárné ukončení vývoje. Proto nepřekvapí, že u živočichů jsou mutace komplexu ARP2/3 zpravidla letální. Například u háďátka *Caenorhabditis elegans* je aktivita komplexu ARP2/3 a N-WASP nezbytná pro migraci hypodermálních buněk a RNA interference podjednotek komplexu nebo jeho NPF vede k zastavení embryogeneze a embryonální letalitě (Sawa, 2003). V případě vývoje embrya u octomilky (*Drosophila melanogaster*) je komplex ARP2/3 nezbytný pro celularizaci původně mnohohojaderného embrya a mutace podjednotky ARPC1 vede k problémům při tvorbě blastodermu (Stevenson et al., 2002). Měňavkovitý pohyb používají při vyhledávání patogenů bílé krvinky. Mutace v NPF z rodiny WASP, který je specificky exprimován v hematopoetických buňkách vede k nemoci označované jako Wiskott-Aldrich syndrome (WAS), která dala této rodině proteinů jméno. Makrofágy pacientů s touto chorobou nejsou schopné aktivovat komplex ARP2/3, který je nezbytný pro tvorbu lamellipodií, a tudíž ztrácí schopnost chemotaktického pohybu za patogeny, což způsobuje imunodeficienci (Zicha et al., 1998). Při vývoji lidského mozku musí dojít k propojení přibližně 1,6 milionů kilometrů neuronových axonů (Pollard and Borisy, 2003). Tvorba a větvení axonů jsou závislé na aktivitě komplexu ARP2/3, stejně jako jejich směrovaný růst, skrze tvorbu lamellipodií a filopodií v růstovém kuželu (Kalil and Dent, 2014; Korobova and Svitkina, 2008). Kromě fyziologických funkcí má komplex ARP2/3 svou roli i v závažných patologiích jako je rakovinné bujení. Lamellipodiální pohyb používají nádorové buňky pro invazi do zdravé tkáně a tvorbu metastáz. Míra exprese komplexu ARP2/3 a WAVE2 je například signifikantně vyšší u metastázujících případů rakoviny plic (Semba et al., 2006). Pro význam komplexu ARP2/3 ve tvorbě metastáz svědčí i fakt, že RNAi jeho podjednotek v linii buněk rakoviny slinivky břišní HPAFII vedla ke snížení jejich migrace až o 68% (Rauhala et al., 2013).

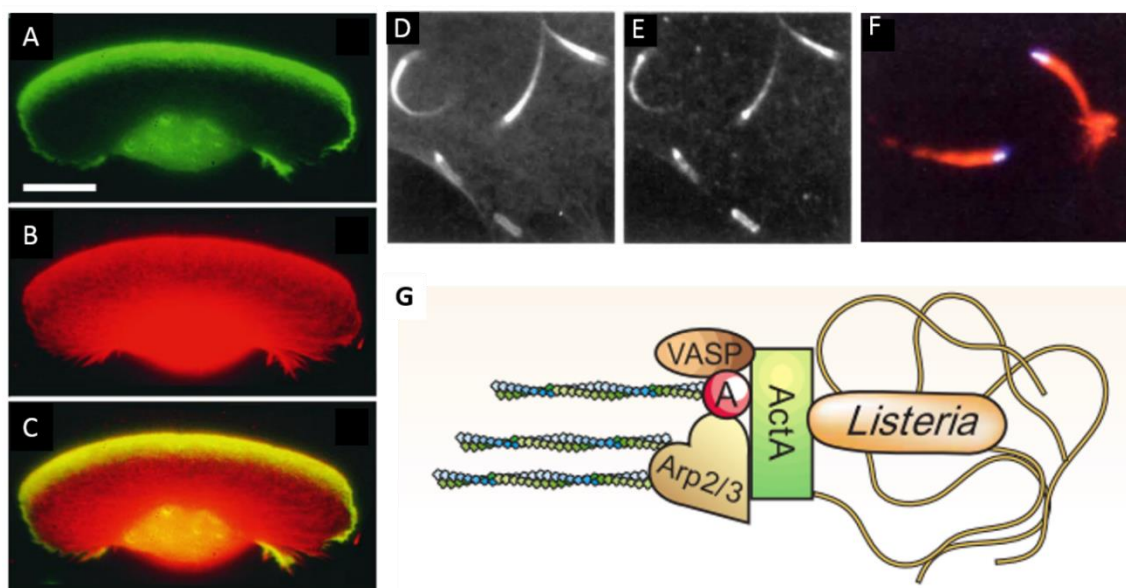
2.3.2 Kvasinky

U kvasinek má komplex také významnou roli v remodelaci aktinového cytoskeletu, obzvláště v tvorbě, pohybu a distribuci aktinových ostrůvků (actin patches), dynamických struktur složených z větvených aktinových vláken v kortikální vrstvě buněk, které hrají roli v endocytóze a remodelaci buněčné stěny (Young et al., 2004). Fúzování vakuol v kvasinkových buňkách je také výrazně narušeno ať už při mutaci podjednotek komplexu ARP2/3 nebo zablokování faktoru LAS17p (kvasinkový homolog faktoru WASP) (Eitzen et al., 2002). V neposlední řadě

hraje kvasinkový komplex ARP2/3 roli v pohyblivosti některých organel, například mitochondrií. Komplex ARP2/3 v kvasinkách asociuje s mitochondriemi a mutanti v podjednotkách ARP2 a ARPC5 vykazují pomalejší pohyb těchto organel podél aktinových vláken a problémy s dědičností mitochondrií při pučení (Boldogh et al., 2001). Zdá se, že kvasinkové mitochondrie se alespoň částečně pohybují pomocí polymerace aktinu, podobně jako některé patogenní bakterie (viz Prokaryota a viry). Komplex ARP2/3 u kvasinek ale není tak esenciální jako u živočichů. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* s mutacemi v jednotlivých podjednotkách vykazovaly stoprocentní letalitu pouze při nepřítomnosti podjednotky ARPC1 (Arc40p), v případě mutací jiných podjednotek ale vykazovaly různou míru viability (ARP2 – 11 %, ARP3 – 16 %, ARPC2 – 2,5 %, ARPC4 – 52 %, ARPC3 – 88 %, ARPC5 – 11 %) (Winter et al., 1999). To ukazuje na možnost, že i nekompletní komplex může být v kvasinkách částečně funkční.

2.3.3 Prokaryota a viry

Prudkou polymerací aktinu se v hostitelské buňce pohybují i některé prokaryotické patogeny, např. bakterie *Listeria monocytogenes*. Běžný pohyb pomocí bakteriálních bičíků není v husté eukaryotické cytoplasmě možný, proto využívá reakčního pohonu, kdy na jednom svém pólu kumuluje membránový protein ActA, který napodobuje WASP. ActA rekrutuje a aktivuje komplex ARP2/3 a polymerující aktinová vlákna tlačí bakterii dopředu za vzniku tzv. aktinové komety (Welch et al., 1997), (Obrázek 6, D-G). Podobný pohyb pomocí aktinových komet využívají pro svůj pohyb i některé viry např. virus neštovic (*Vaccinia*), který k aktivaci komplexu ARP2/3 využívá složitější mechanismus zahrnující membránový protein A36R, který po fosforylaci hostitelskou buňkou rekrutuje na virový obal komplex adaptorových proteinů a N-WASP. Mutace v A36R vede ke ztrátě pohyblivosti viru (Wolffe et al., 1998). Aktivace komplexu ARP2/3 je významná i pro vstup viru HIV do buňky a jeho množení. RNAi podjednotky ARP2 v hostitelských buňkách brání jejich infekci, konstitutivní inhibice komplexu ARP2/3 overexpresí domény VCA v T-lymfocytech blokuje replikaci viru. Z těchto pokusů vyplývá, že komplex ARP2/3 hraje významnou roli v časně fázi životního cyklu viru HIV. Mechanismus, kterým virus ovlivňuje funkci komplexu ARP2/3, se tak stává potenciálním cílem chemoterapeutické léčby AIDS (Komano et al., 2004).



Obrázek 6: Polymerace aktinu řízená komplexem ARP2/3 jako zdroj buněčné motility u živočišných (A-C) a bakteriálních buněk (D-G). Keratinocyt drápatky s protilátkami značenou podjednotkou ARPC3 (A) a aktinovým filamenty značenými TRITC-faloidinem (B), složený obrázek (C) ukazuje, že vznik lamellipodia je závislý na polymeraci aktinu řízené komplexem ARP2/3 na čelním okraji buňky. (převzato ze Svitkina, 1999) Pohyb bakterie *Listeria monocytogenes* v buňkách HeLa je zprostředkován polymerací aktinu (D) řízenou komplexem ARP2/3 (E), bakterie se tak v eukaryotické buňce pohybují reaktivním pohybem za vzniku tzv. aktinových komet (F, modře bakterie, červeně aktin). (upraveno podle Welch et al., 1997) Model formování aktinové komety u bakterie *Listeria monocytogenes* (G). ActA, bakteriální protein, který napodobuje WASP, rekrutuje komplex ARP2/3 na jednom pólu bakterie. Dalšími doménami ActA váže aktinový monomer a VASP (vasodilator-simulated phosphoprotein) což vede k aktivaci komplexu ARP2/3 a tvorbě aktinové komety (převzato z Gruenheid and Finlay, 2003).

2.4 Komplex ARP2/3 u rostlin

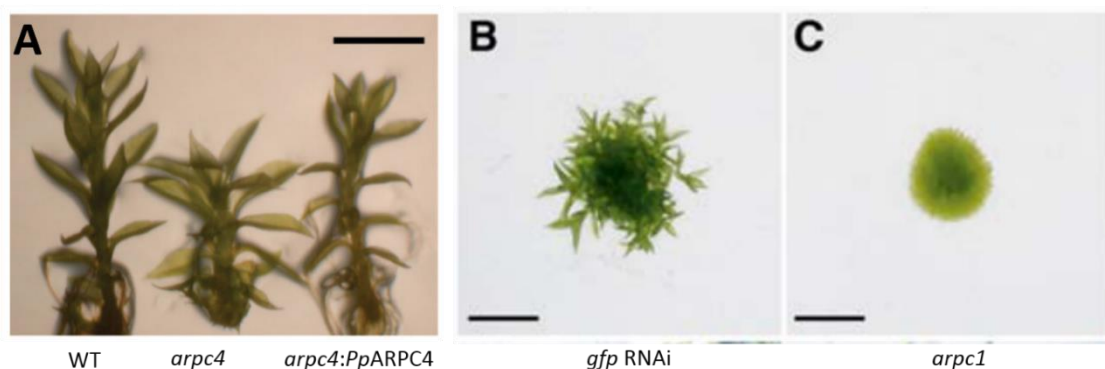
Na rozdíl od živočichů nejsou mutace komplexu ARP2/3 u rostlin letální, projevují se spíše mírnými fenotypy. Typicky vykazují rostliny *Arabidopsis thaliana* postrádající podjednotky komplexu ARP2/3 nebo aktivačního komplexu SCAR/WAVE poruchy morfogeneze na buněčné úrovni, jsou ale životaschopné, fertilitní a vytváří všechny orgány. To souvisí pravděpodobně s jinou úlohou komplexu ARP2/3 u obou skupin. Zatímco u živočichů je regulace aktinu nezbytná pro pohyb buněk, v nepohyblivých rostlinných buňkách je aktinový cytoskelet spolu s mikrotubulárním krucíálem pro tvarování buněk.

2.4.1 Role komplexu ARP2/3 u rostlin

Komponenty komplexu ARP2/3 najdeme u některých řas jako *Volvox carterii* (kromě ARPC5), nebo u *Ostreococcus tauri* (kromě ARPC1 a ARPC5). Jejich funkce v těchto organismech ale nebyla zkoumána, stejně málo prostudovaná je i funkce samotného aktinového cytoskeletu u řas. Některé řasy, například *Micromonas* komplex druhotně ztratily, podobně jako geny pro

NPF. Zajímavostí je, že genom váleče *Volvox carterii* neobsahuje žádné známé NPF a není tedy jasné zda, a jak je jeho komplex ARP2/3 aktivován (Kollmar et al., 2012).

Apikální růst a větvení prvoklíčků mechu *Physcomitrella patens* je spojeno s tvorbou výrazných aktinových maxim lokalizovaných do špičky apikální buňky a místa budoucího vzniku větve, v rostoucím pupenu gametoforu vzniká komplexní vzor těchto maxim (Finka et al., 2007). Umlčení exprese podjednotky ARPC1 u *Physcomitrella patens* pomocí RNA interference mělo za následek dramatické změny fenotypu projevující se jako neschopnost vytvářet dlouhé vláknité prvoklíčky a pravidelně rozmisťovat buněčné přepážky. Dále se mutace projevovala neschopností vytvořit klasický listnatý gametofor (a to ani po cytokininové indukci), místo kterého vznikaly pouze shluky nepravidelně tvarovaných buněk (Obrázek 7). Mutace také vedla k abnormalitám ve větvení prvoklíčku (Harries et al., 2005). Delece podjednotky ARPC4 vedla pouze k poruchám apikálního růstu vláknitých prvoklíčků, ale mutantů vytvářeli klasické listnaté gametofory, byť o něco menší (Obrázek 7) (Perroud and Quatrano, 2006). Výraznější fenotyp mutantu *arpc1* byl shodný s fenotypem mechových rostlin pěstovaných na mediu s cytoskeletální drogou latrunkulin B, která dezintegruje aktinový cytoskelet. Zdá se tedy, že komplex bez ARPC1 není u *Physcomitrella patens* vůbec schopen nukleovat polymeraci aktinových vláken, zatímco komplex bez podjednotky ARPC4 si svou funkci částečně zachovává. Další možností je, že podjednotka ARPC1 hraje roli i mimo komplex. Tento silný efekt ztráty podjednotky ARPC1 ve srovnání s podjednotkou ARPC4 je ve shodě s daty získanými u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Winter et al., 1999) a poukazuje na možnost, že jednotlivé podjednotky mají různé funkce a jsou různě důležité pro funkci komplexu. Tomu by napovídalo i zjištění, že mutace v BRICK1, komponentě aktivačního komplexu SCAR/WAVE, vyvolává u *Physcomitrella patens* mírnější fenotypové projevy (poruchy apikálního růstu), podobné spíše mutaci v podjednotce ARPC4, než v ARPC1 (Perroud and Quatrano, 2008). Finka et al. (2007) popisují defekty v apikálním růstu u prvoklíčků s mutací v podjednotce ARPC3 spojené s absencí aktinového maxima ve špičce apikální buňky prvoklíčku. Nevyjadřují se ale bohužel k efektu mutace na tvorbu gametoforu. Vizualizace podjednotky ARPC1, ideálně pomocí fúze s fluorescenčním proteinem v živých buňkách a její kolo-kalizace s podjednotkou ARPC3, ARPC4 a aktinovým cytoskeletem by jistě napověděla více o celistvosti komplexu a jeho vlivu na organizaci aktinu v tomto zajímavém systému.



Obrázek 7: Význam komplexu ARP2/3 u mechu *Physcomitrella patens*. Delece podjednotky ARPC4 způsobuje pouze mírné fenotypové změny způsobené hlavně poruchami prodlužovacího růstu (A, upraveno podle Perroud and Quatrano, 2006). Umlčení exprese podjednotky ARPC1 pomocí RNA interference vede k daleko závažnějším projevům, kdy mutant není schopen vytvořit trojrozměrnou strukturu listnatého gametoforu (B – kontrolní RNAi genu pro GFP, C – RNAi genu pro ARPC1, upraveno podle Harries et al., 2005).

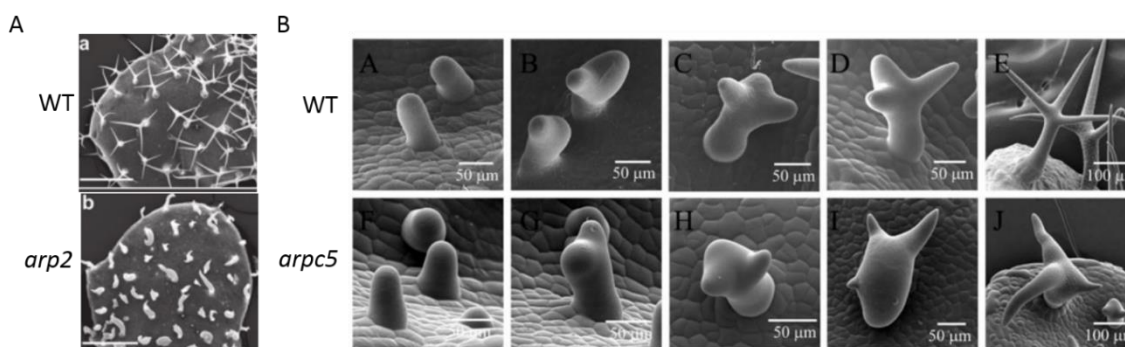
Genom *Arabidopsis thaliana* obsahuje geny pro všechny podjednotky komplexu ARP2/3. Geny pro ARPC1 a ARPC2 jsou v jeho genomu duplikované, označované jako ARPC1a, ARPC1b, ARPC2a a ARPC2b. Mutace v podjednotkách komplexu ARP2/3 jsou u *Arabidopsis thaliana* mírné, rostliny jsou schopné normálního růstu, jsou fertilitní a vytváří všechny orgány. Typickým projevem mutací podjednotek komplexu ARP2/3 jsou defekty v morfogenezi na buněčné úrovni. Nejvýraznější fenotypové změny se projevují u komplexně tvarovaných buněk, jako jsou trichomy a laločnaté pokožkové buňky. Skupina mutantů označovaná podle fenotypu trichomů jako *distorted* zahrnuje několik mutantů podjednotek komplexu ARP2/3 a komplexu SCAR/WAVE (Tabulka 2). DISTORTED1 odpovídá podjednotce ARP3 (Mathur et al., 2003a), DISTORTED2 podjednotce ARPC2 (El-Din El-Assal et al., 2004). Mutant *crooked* má mutaci v podjednotce ARPC5 (Mathur et al., 2003b) a WURM odpovídá podjednotce ARP2 (Mathur et al., 2003a). Všechny ostatní podjednotky komplexu ARP2/3 mají stejný fenotyp jako mutanti skupiny *distorted*. Další mutanti skupiny *distorted* odpovídají mutacím v podjednotkách komplexu SCAR/WAVE. Například protein DISTORTED3 odpovídá SCAR2 (Basu et al., 2005), *gnarled* je mutant v NAP1, podjednotce regulačního komplexu SCAR/WAVE (El-Assal et al., 2004), *pirogi* (také označovaný jako *klunker*) je mutant v podjednotce PIR1 (odpovídá SRA1) (Basu et al., 2004). Obě tyto podjednotky jsou nezbytné pro aktivační funkci komplexu SCAR/WAVE a jejich mutace vyvolává fenotyp odpovídající mutacím v komplexu ARP2/3 (Li et al., 2004). Do mutantů skupiny *distorted* patří také mutant v podjednotce BRICK1 (také označované jako HSP300) (Le et al., 2006). *Arabidopsis thaliana* obsahuje 4 homology genu SCAR/WAVE, fenotyp vícečetných mutantů je aditivní a zároveň je možné např. mutaci *scar2* komplementovat expresí genu SCAR3 pod 35s promotorem (Zhang et al., 2008).

Velmi podobný efekt jako mutace skupiny *distorted* vyvolává u trichomů přidání cytoskeletální drogy cytochalasinu D (Mathur et al., 1999).

Tabulka 2: Mutanti skupiny *distorted*, projevující se typicky deformovanými trichomy. Jedná se většinou o mutanty v podjednotkách komplexu ARP2/3 a komplexu SCAR/WAVE. Hvězdičkou jsou označeni *distorted* mutanti z původní práce (Hülkamp et al., 1994).

Mutant	Protein	TAIR označení	reference
<i>distorted1</i> *	ARP3	AT1G13180	(Mathur et al., 2003a)
<i>distorted2</i> *	ARPC2	AT1G30825	(El-Din El-Assal et al., 2004)
<i>distorted3</i>	SCAR2	AT2G38440	(Basu et al., 2005)
<i>brick1</i>	BRICK1	AT2G22640	(Le et al., 2006)
<i>crooked</i> *	ARPC5	AT4G04710	(Mathur et al., 2003b)
<i>gnarled</i> *	NAP1	AT2G35110	(El-Assal et al., 2004)
<i>pirogi</i> *	PIR1	AT5G18410	(Basu et al., 2004)
<i>spirrig</i> *	BCHA1	AT1G03060	(Saedler et al., 2009)
<i>wurm</i> *	ARP2	AT3G27000	(Mathur et al., 2003a)
<i>alien</i> *	ALIEN	ALI	(Schwab et al., 2003)

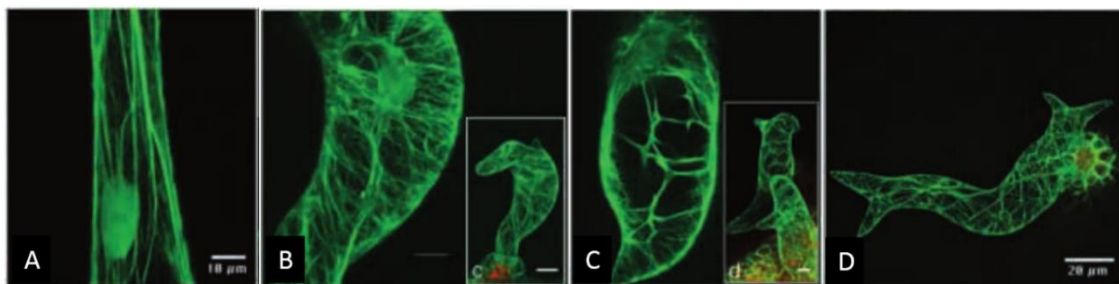
Trichomy *Arabidopsis thaliana* jsou jednobuněčné, ale zároveň tvarově komplexní deriváty pokožkových buněk. Typicky vytvářejí tři špičaté větve. Trichomy mutantů skupiny *distorted* jsou zkrácené, nepravidelně ztlustlé a pokroucené. Dochází k tloušťnutí „stonku“ a případně větví trichomu, všemi směry kolmými k ose růstu, trichomy mohou být nafouknuté do té míry, že nelze najít bod větvení. Může docházet ke zkroucení větví kolem jejich osy a k ohýbání větve od normálního směru jejich růstu (Schwab et al., 2003). Větve trichomů jsou založeny ve správném počtu, ale selhává jejich prodlužování (Li et al., 2003) (Obrázek 8), trichomy WT a mutantů jsou nerozlišitelné až do fáze, kdy je dokončena iniciace větví. Křížení mutantů skupiny *distorted* s mutanty, kteří vykazují defektní větvení trichomů (např. *stichel*, který má nevětvené trichomy, nebo naopak *noeck*, který má více větví) vedlo ke vzniku deformovaných trichomů s menším nebo větším počtem větví, jak odpovídalo oběma mutacím. To prokázalo nezávislost role *distorted* genů s geny řídícími větvení trichomů (Schwab et al., 2003). Pozorování pomocí časosběrného videa a latexových kuliček ukázalo, že trichomy na rozdíl od kořenových vlásků a pylových láček rostou difusním růstem (Schwab et al., 2003), což o dvanáct let později potvrdil Yanagisawa s polystyrenovými kuličkami (Yanagisawa et al., 2015). Díky kuličkám přichyceným na povrchu trichomu bylo možné pozorovat rychlost růstu jednotlivých jeho částí. Ukázalo se, že trichomy rostou v celé délce, ale ve vrcholové části až 4x rychleji. Pozorování růstu u mutantů ukázalo, že jejich expansní růst je regionálně nevyrovnaný a selhává tedy řízení rychlosti růstu na subbuněčné úrovni (Schwab et al., 2003).



Obrázek 8: Vývoj trichomů mutantů v podjednotkách komplexu ARP2/3. A: srovnání trichomů WT a mutantu v podjednotce ARP2 (převzato z Li et al., 2003) B: srovnání vývoje trichomů u WT a mutantu v podjednotce ARPC5 (*crooked*) – je patrné že trichomy se vyvíjí bez větších problémů, až do stadia, kdy jsou založeny větve, pak dochází k deformaci vlivem selhání prodlužování větví a neřízenému tloustnutí trichomového „stonku“ (upraveno dle Schwab et al., 2003).

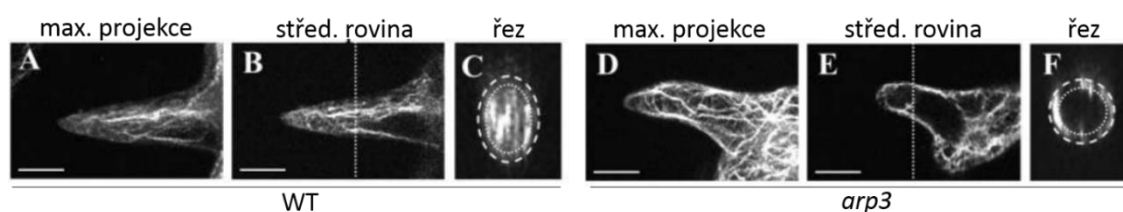
Na subbuněčné úrovni se mutace v komplexu ARP2/3 a komplexu SCAR/WAVE projevují změnou uspořádání aktinového cytoskeletu. To odpovídá pozorování, že aplikace drog cytochalasinu D a latrunkulinu B, které destabilisují aktinový cytoskelet, vytváří trichomový fenotyp velmi podobný mutantům skupiny *distorted*, stejně jako phalloidin, který naopak brání depolymeraci aktinových vláken (Mathur et al., 1999). Stejný efekt destabilisujících i stabilizujících drog naznačuje, že není důležitá jen přítomnost aktinového cytoskeletu, ale i jeho schopnost dynamické reorganizace. Stejně jako u fenotypu vyvíjejícího se trichomu, jsou první změny v uspořádání aktinového cytoskeletu pozorovatelné po založení všech tří větví (Schwab et al., 2003) a objevují se ještě před prvními pozorovatelnými změnami morfologie trichomů (Mathur et al., 1999). V trichomu WT jsou aktinová vlákna uspořádána rovnoběžně s osou růstu, zatímco u trichomů mutantů skupiny *distorted* jsou aktinová filamenta kratší a neuspořádaná, náhodně překřížená a často orientovaná kolmo k ose růstu (Mathur et al., 1999; Schwab et al., 2003) (Obrázek 9). V mutantech skupiny *distorted* také dochází ke změnám uspořádání mikrotubulárního cytoskeletu, které odpovídají změnám nastávajícím po ošetření rostlinek drogami, které rozrušují aktinový cytoskelet (Schwab et al., 2003). Trichomy rostlinek ošetřených mikrotubulárními drogami vykazovaly také změny v růstu trichomů, ale zjevně jiné než mutanti skupiny *distorted*. Zdá se, že mikrotubuly jsou důležité

pro správné založení větví trichomů a aktinový cytoskelet řízený komplexem ARP2/3 hraje roli v jejich následném rychlém prodlužování (Mathur et al., 1999).



Obrázek 9: Uspořádání aktinové sítě v trichomech *Arabidopsis thaliana* – v trichomech WT jsou patrné dlouhé kabely aktinu uspořádané paralelně s osou trichomu (A). U mutantu *nap1* (*gnarled*) je vidět mnoho jemnějších aktinových filament uspořádaných příčně k ose trichomu, dlouhá podélná vlákna chybí (B). Mutant *arp3* (*wurm*) se vyznačuje neuspořádanými aktinovými kabely (C) podobně jako mutant *arp2* (*distorted1*) (D) (upraveno podle Mathur et al., 1999).

3D rekonstrukce aktinové sítě v trichomech ukázala, že mutant *arp3* kromě typické neuspořádanosti aktinového cytoskeletu vykazuje také jeho jinou prostorovou lokalizaci (Obrázek 10). Zatímco u WT probíhala aktinová vlákna hlavně středem větve, u *arp3* byla aktinová vlákna lokalizována především u buněčné stěny (Li et al., 2004). Mutanti v proteinech PIR a NAP se fenotypově projevují jako typičtí mutanti ze skupiny *distorted* a distribuce aktinu je u nich v cca dvou třetinách případů stejná jako u *arp3*, v jedné třetině je naopak ještě více aktinu v centru trichomové větve. Tyto výsledky ukazují na význam dráhy SCAR/WAVE – komplex ARP2/3 při uspořádávání aktinové sítě do kabelů vedoucích rovnoběžně s osou růstu. To je nečekané vzhledem k předpokládané funkci komplexu ARP2/3 ve větvení aktinového cytoskeletu a tvorbě jemné aktinové sítě.

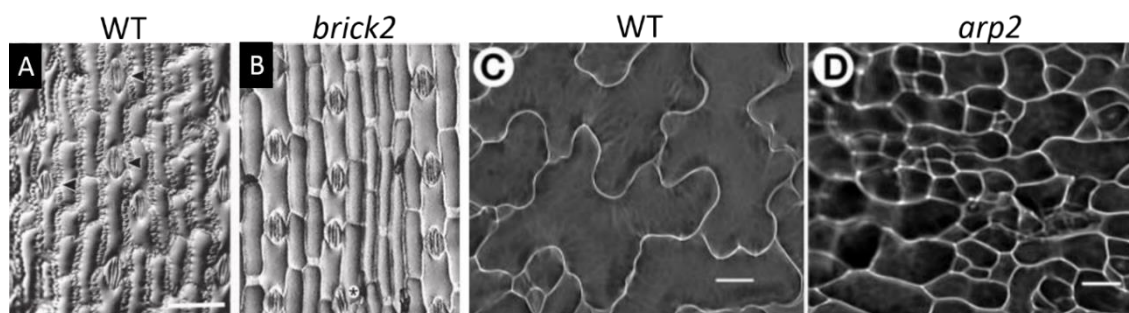


Obrázek 10: 3D rekonstrukce aktinového cytoskeletu v trichomech WT a *arp3* (značeno phaloidinem). Na maximálních projekcích je vidět že aktinová vlákna v trichomu mutantu jsou méně uspořádaná (D) než u WT (A). Na optickém řezu středem trichomu je vidět, že u WT je většina vláken ve středu větve (B), zatímco u *arp3* u stěny (E). To samé je vidět i na příčných průřezích větví trichomu (C, F). (upraveno dle Li et al., 2004).

Regulace růstu souvisí s pohybem váčků odvozených od GA, které do místa růstu přinášejí komponenty buněčné stěny a které slouží také jako zdroj membrán. Ty se pohybují po aktinovém cytoskeletu a bylo pozorováno, že v místě, kde dochází k růstu, se vyskytuje jemně větvený aktin (fine actin) zatímco nerostoucí oblasti obsahují hustý svazkovaný aktin. V místech hustého nahloučení aktinových vláken dochází k pomalejšímu pohybu váčků, až k jejich kumulaci, což může bránit jejich dopravě na místo určení (Mathur et al., 2003b). Jemná aktinová síť je zřejmě nezbytná pro splývání váčků s plasmatickou membránou. Pozorování, že v trichomech mutanta *arp5* dochází ke kumulaci váčků Golgiho aparátu v místech, kde trichomy nerostou, odpovídá představě, že absence jemného aktinu v trichomech vede k problémům se splýváním těchto váčků s plasmatickou membránou, což způsobuje poruchy difusního růstu (Mathur et al., 2003b).

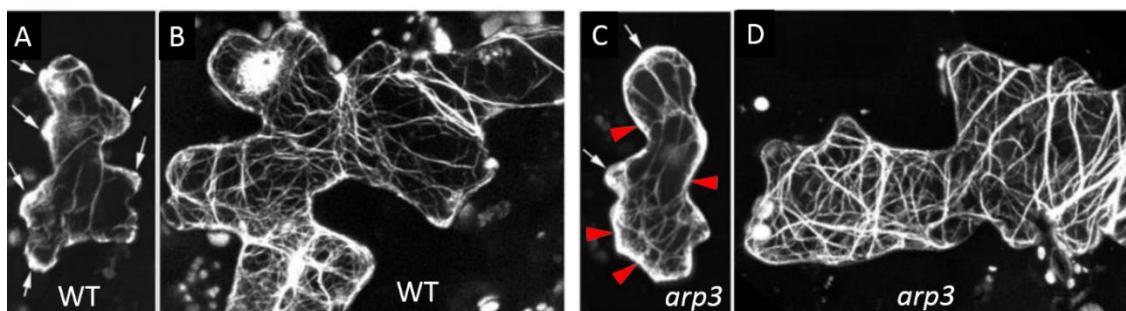
Význam aktinového cytoskeletu a komplexu ARP2/3 ve splývání membrán podporuje i fakt, že mutanti *arp3* a *arp2* mají problém s fúzí malých vakuol. Typicky malé vakuoly v průběhu vývoje splývají do jedné velké, mutanti ale mají v buňkách stále mnoho malých vakuol (Mathur et al., 2003a). To u *arp3* potvrdili i Li et al. (2004), kteří stejný jev pozorovali u mutantů v podjednotkách komplexu SCAR/WAVE *nap1* a *pir1*. Stejný problém se splýváním vakuol mají i kvasinkoví mutanti v ARP2 či LAS17p (kvasinkový homolog WASP) (Eitzen et al., 2002). Difusní růst je poháněn turgorovým tlakem, který může dosahovat 2 – 50 atmosfér (Monshausen and Gilroy, 2009) a který dodává energii pro expansi rigidní buněčné stěny. Vzhledem k tomu může mít defekt fúze vakuol nezanedbatelný vliv na buněčnou morfogenezi.

Pokožkové buňky děložních a pravých listů mají typický složitý tvar, kdy do sebe jednotlivé jejich laloky zapadají podobně jako dílky puzzle. U mutantů v komplexu ARP2/3 a komplexu SCAR/WAVE jsou epidermální buňky méně laločnaté, tím se snižuje délka spoje mezi sousedními buňkami a zvyšuje se jejich cirkularita (Li et al., 2003; Mathur et al., 2003a). Například u pokožkových buněk listu kukuřice jsou sousedící buňky laterálně propojeny soustavou laloků, které zcela zmizí při mutaci proteinu BRICK, jedné podjednotky komplexu SCAR/WAVE a buňky vytvoří jednoduché spoje (Obrázek 11). Takové buňky pak připomínají cihličky, což dalo mutantovi jméno (Frank, 2003).



Obrázek 11: Význam ARP2/3 v morfogenezi pokožkových buněk. Pokožkové buňky se vyznačují složitými tvary, které zvyšují plochu mezibuněčných propojení (A). Mutace proteinu BRICK, podjednotky komplexu SCAR/WAVE vede k vymizení laloků a buňky pak vypadají jako jednoduché cihličky (B) – což dalo mutantovi jméno (převzato z Frank, 2003). snížení laločnatosti je patrné i u pokožkových buněk mutantů v komplexu ARP2/3 u *Arabidopsis thaliana* (C, D) (převzato z Mathur et al., 2003a).

stejný vliv na morfogenezi pokožkových buněk má mutace *brick* i u *Arabidopsis thaliana*, kde mají pokožkové buňky méně laloků a vyšší cirkularitu (Le et al., 2006). Kromě toho někteří autoři popisují u mutantů v podjednotkách komplexu ARP2/3 vznik mezer (gaps) mezi epidermálními buňkami (Kotchoni et al., 2009; El-Din El-Assal et al., 2004; Basu et al., 2005; Li et al., 2004) a nesoudržnost epidermálních buněk hypokotylu, které se oddělují především v oblasti transversálních stěn a krouť se, čímž se odchlipují od roviny epidermis (Mathur et al., 2003a, 2003b). V pokožkových buňkách mutantů v komplexu ARP2/3 také dochází ke změnám v uspořádání aktinových vláken (Li et al., 2003). U WT je typický jemný F-aktin lokalizovaný do oblastí vyvíjejících se laloků, kde zřejmě podporuje růst tím, že řídí splývání exocytických váčků s plasmatickou membránou. U mutantů *arp2* a *arp3* dochází k založení laloků, ale jejich růst se následně zastavuje, což je zřejmě důsledkem toho, že jemný F-aktin není lokalizován cíleně do laloků, ale takřka rovnoměrně podél celého okraje buňky (Obrázek 12). Také se zdá, že aktinové kabely, které u WT propojují přednostně „sedla“ mezi laloky, jsou u mutantu uspořádána více náhodně a častěji vedou přímo do laloků. U maturovaných pokožkových buněk je uspořádání aktinových kabelů víceméně náhodné, zdá se ale, že u mutantů *arp2* a *arp3* jsou kabely častěji kolmé k delší ose buňky (Li et al., 2003).



Obrázek 12: Distribuce aktinu v pokožkových buňkách WT (A, B) a mutanta *arp3* (C, D). U WT je patrný jemný F-aktin v místě vznikajících laloků (A, bílé šipky), zatímco u mutanta *arp3* je jemný F-aktin distribuován rovnoměrněji podél okraje buňky a často se vyskytuje i „sedlech“ mezi laloky (červené klínky). Zdá se také, že aktinové kabely propojují u WT místa vykousnutí (A), zatímco u mutantů jsou uspořádána náhodněji a častěji vedou do laloků (C). V dospělých pokožkových buňkách WT (B) a *arp3* (D) jsou vlákna uspořádána náhodně, zdá se ale, že u mutanta jsou častěji kolmo k delší ose buňky (upraveno dle Li et al., 2003).

Pylové láčky rostou apikálním růstem a aktinový cytoskelet je pro jejich růst nezbytný (Vidali et al., 2001). Kromě silných svazků aktinu, po kterých se pohybují váčky, které jsou zdrojem membrán i stěnového materiálu, je pro růst nezbytná také subapikální síť jemného aktinu, která váčky zřejmě zachycuje a dopravuje je do apexu. Jemná subapikální aktinová síťovina je dynamičtější a tudíž náchylnější k rozrušení cytoskeletárními drogami, než aktinové kabely. Její rozrušení vede k zastavení apikálního růstu i při zachování cytoplasmatického proudění závislého na silných svazcích (Vidali et al., 2001). Podobná jemná aktinová síťovina je pozorovatelná i v apikálních buňkách prvoklíčku mechu *Physcomitrella patens*, kde je závislá na přítomnosti komplexu ARP2/3 a komplexu SCAR/WAVE (Perroud and Quatrano, 2008; Harries et al., 2005; Perroud and Quatrano, 2006). Z této podobnosti by se dalo očekávat, že funkce komplexu ARP2/3 bude v obou systémech stejná. Pro význam komplexu v apikálním růstu pylové láčky svědčí i lokalizace silné exprese GUS pod promotorem podjednotky ARP2 právě v klíčících pylových láčkách (Klahre and Chua, 1999). Přesto však mutanti v podjednotkách komplexu ARP2/3 ni SCAR/WAVE nevykazují typicky žádné defekty v růstu pylových láček a jsou zcela fertilní (Li et al., 2003; Le et al., 2003; Mathur et al., 2003a; El-Din El-Assal et al., 2004). Podobně, růst kořenových vlásků, který je velmi podobný jako růst pylových láček, je u mutantů většinou normální. U *arpc2* (Mathur et al., 2003a) a *arpc5* (Mathur et al., 2003b) byly hlášeny mírně zvlněné kořenové vlásky, či dokonce tvorba více vlásků z jednoho trichoblastu nebo větvení kořenových vlásků (Mathur, 2005). Tyto projevy jsou zajímavé proto, že podobné efekty vytváří na kořenových vláscích aplikace mikrotubulárních drog, konkrétně vystavení oryzalinu vede ke vzniku zvlněných vlásků a aplikace taxolu ke tvorbě větvených kořenových vlásků (Bibikova et al., 1999). Je s podivem že mutace v komplexu ARP2/3 by vedla ke stejnému efektu jako protichůdně působící mikrotubulární drogy, kdy oryzalin mikrotubulární cytoskelet rozrušuje a taxol stabilisuje. Může se jednat o složitou

funkční provázanost mezi aktinovým a mikrotubulárním cytoskeletem, kdy uspořádání jednoho ovlivňuje uspořádání druhého, což bylo rozpracováno v několika publikacích (Schwab et al., 2003; Sambade et al., 2014). V jiných pracích však nebylo pozorováno větvení ani vlnění kořenových vlásků ani u *arpc2* (Le et al., 2003) ani u *arpc5* (Li et al., 2003). Může se jednat o projev, který se manifestuje pouze při určitých kultivačních podmínkách. Z těchto pozorování se zdá, že apikální růst kořenových vlásků a pylových láček *Arabidopsis thaliana* je založen na jiném principu než apikální růst prvoklíčků *Physcomitrella patens*. Vizualizace komplexu ARP2/3 případně podjednotek komplexu SCAR/WAVE spolu s aktinovým cytoskeletem v tomto systému by byla velmi přínosná pro osvětlení mechanismu stojícího za apikálním růstem v *Arabidopsis thaliana*.

Průduchy mutantů *arpc2* mají výrazně nižší odpověď na ABA, která zřejmě řídí rychlou reorganizaci aktinu ve svěracích buňkách a tím míru jejich otevření (Jiang et al., 2012). Průduchy mutantů *arpc4* a *arpc5* reagovaly pomaleji na H₂O₂, který způsobuje zavírání průduchů, což je zřejmě způsobeno pozorovanou pomalejší reorganizací aktinového cytoskeletu v jejich svěracích buňkách (Li et al., 2014).

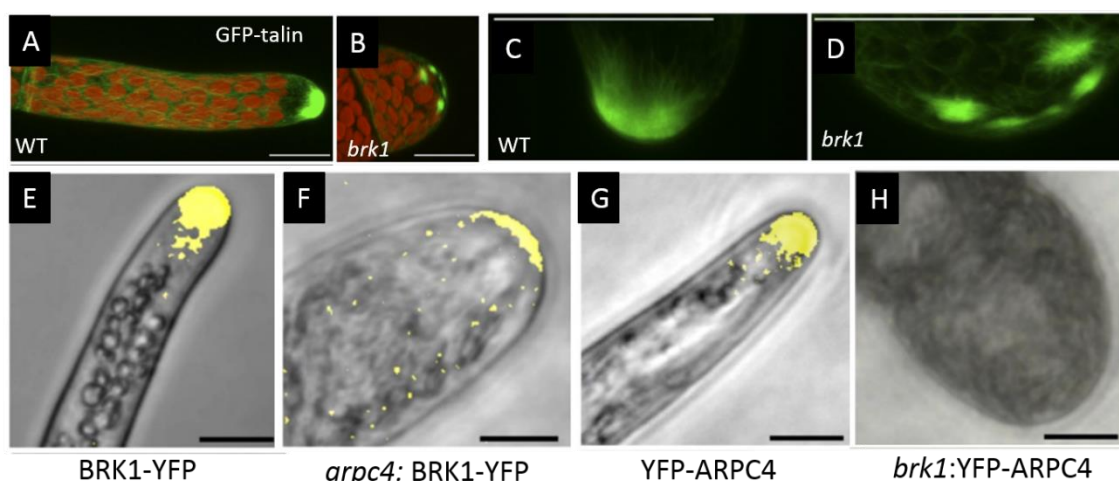
Na úrovni celé rostliny se projevují mutace v komplexu ARP2/3 například zkráceným hypokotylem (Kotchoni et al., 2009) a celkově menšími rostlinkami (Li et al., 2003). Projevy mutace jsou obzvláště dobře patrné u semenáčků pěstovaných ve tmě, kde mutanti mají výrazně kratší hypokotyly než etiolované WT rostliny (Mathur et al., 2003b). Dynamika aktinu řízená komplexem ARP2/3 je tedy nezbytná pro správnou elongaci hypokotylových buněk. Kromě toho hraje regulace aktinu pomocí komplexu ARP2/3 roli také při gravitropismu a fototropismu, jak ukázaly pokusy s etiolovanými semenáčky mutantů *arp3* a *arpc2* (Reboulet et al., 2010).

Vliv mutací komplexu ARP2/3 nebo jeho aktivačního komplexu SCAR/WAVE je na první pohled zanedbatelný. V ekologickém kontextu je ale třeba si uvědomit, že funkční trichomy představují jednu z prvních linií obrany před herbivory a hustota trichomů u rostlin *Arabidopsis thaliana* pěstovaných v realistických přírodních podmínkách při polním experimentu statisticky signifikantně zvyšuje odolnost proti okusu hmyzími herbivory (Mauricio, 1998). Bylo by zajímavé ověřit, zda jsou deformované trichomy mutantů skupiny *distorted* schopné plnit svou obranou funkci. Méně nápadný, ale o to významnější je v ekologickém kontextu také vliv mutací komplexu ARP2/3 na rychlost zavírání průduchů.

2.5 Lokalizace komplexu ARP2/3 v rostlinách

U mechu *Physcomitrella patens* byla pomocí fúze s fluorescenčním proteinem určena lokalizace podjednotky ARPC4 do apikální části jejího vláknitého prvoklíčku (Perroud and

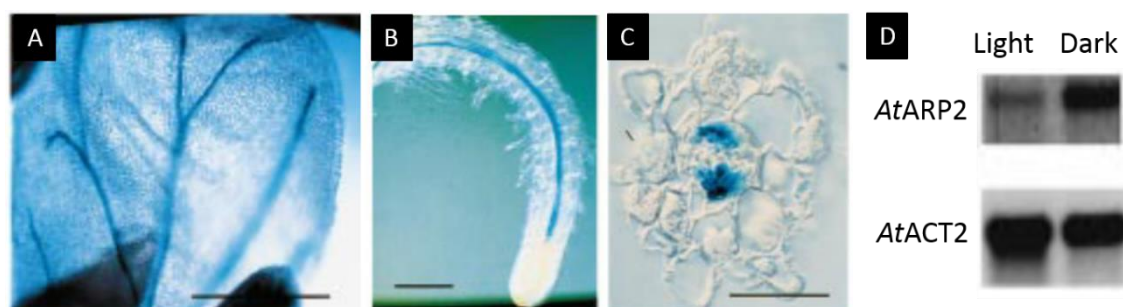
Quatrano, 2006). V tomto místě komplex ARP2/3 zřejmě řídí tvorbu aktinové sítě, která je nezbytná pro apikální růst této struktury (Obrázek 13). Důležitost komplexu ARP2/3 pro tvorbu aktinového maxima podporuje pozorování, že v mutantovi *arp3* zcela mizí a aktin je distribuován homogenně (Finka et al., 2007). Aktinové maximum ve špičce, typické pro WT, značně slábne a rozpadá se do několika nespojitých ostrůvků, pokud dojde k mutaci v proteinu BRICK1. BRICK1 je komponenta aktivačního komplexu SCAR/WAVE, který je taktéž nezbytný pro apikální růst u tohoto mechu, a to nejen kvůli roli v aktivaci komplexu ARP2/3, ale zřejmě i kvůli vlivu na jeho správnou lokalizaci komplexu. V mutantovi *brk1* totiž mizí signál YFP-ARPC4 z apikální části rostoucího prvoklíčku. Naopak v mutantovi *arpc4* je lokalizace BRK1 nezměněna (Perroud and Quatrano, 2008). Vznik a lokalizace aktinového maxima jsou tedy závislé na aktivaci a lokalizaci komplexu ARP2/3 a jeho lokalizace a aktivace je řízena komplexem SCAR/WAVE.



Obrázek 13: Lokalizace systému aktin - komplex ARP2/3 - komplex SCAR/WAVE v prvoklíčcích mechu *Physcomitrella patens*. Ve WT je aktin (značeno pomocí GFP-talin) lokalizován v apikálně rostoucí špičce prvoklíčku (A, C). V mutantovi v jednom z proteinů aktivačního komplexu SCAR/WAVE, BRICK1 je aktinu ve špičce méně a je lokalizován do několika diskrétních ostrůvků (B, D). To zřejmě způsobuje defekty apikálního růstu. Apikální lokalizaci vykazuje jak podjednotka ARPC4 (G), tak BRICK1 (E). BRICK je ve špičce jak ve WT (E), tak v *arpc4* mutantovi (F). Naopak ARPC4 v mutantovi *brk1* z apikální oblasti mizí (H). Zdá se tedy, že BRICK1, respektive komplex SCAR/WAVE je důležitý nejen pro aktivaci ale i pro lokalizaci komplexu ARP2/3 (upraveno dle Perroud and Quatrano, 2008).

Analýza RNA pro podjednotky ARP2 v rostlinkách *Arabidopsis thaliana* ukázala velmi slabou expresi ve všech orgánech, asi stokrát slabší než je exprese aktinu. Fúze promotoru genu ARP2 s reportérem GUS v *Arabidopsis thaliana* ukázala překvapivou lokalizaci exprese této podjednotky do malého počtu buněk obklopujících xylemové elementy a do pylových látek. Vzhledem k blízkosti ke xylemovým elementům by mohly buňky exprimující AtARP2::GUS

představovat prekursory xylemu. Míra exprese podjednotky ARP2 nebyla ovlivněna fytohormony (GA, BL, ABA, 2,4-D) ale vykazovala negativní regulaci světlem (Klahre and Chua, 1999). Silná exprese *AtARP2::GUS* v pylových láčkách je překvapivá, protože mutanti v komplexu ARP2/3 nevykazují žádné viditelné problémy s růstem pylové láčky a jsou zcela fertilní (Le et al., 2003; Mathur et al., 2003a; El-Din El-Assal et al., 2004; Li et al., 2003). Překvapivě se v této práci nezmiňuje lokalizace *AtARP2::GUS* v trichomech a pokožkových buňkách, což jsou struktury, v nichž podle fenotypových projevů mutantů hraje ARP2/3 velkou roli (Schwab et al., 2003).

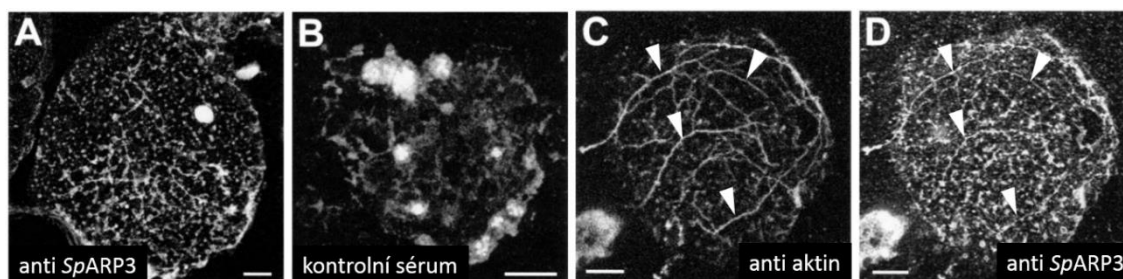


Obrázek 14: Expresse podjednotky ARP2 v *Arabidopsis thaliana* vizualizovaná pomocí GUS. Expresse v okvětním lístku (A), expresse v kořínku (B), příčný řez kořenem ukazuje na expresi v buňkách, ze kterých se diferencuje sekundární xylem (C). Southern blot ukazuje, že na rozdíl od aktinu (spodní řádek) je expresse podjednotky ARP2 negativně regulována světlem (vrchní řádek) (D). (Upraveno dle Klahre and Chua, 1999).

Lokalizace exprese dvou podjednotek komplexu SCAR/WAVE - NAP a PIR – vizualizovaná pomocí exprese GUS pod promotorem *AtPIR* a *AtNAP* ukázala taktéž silnou expresi ve vodivých pletivech (Li et al., 2004). Dá se předpokládat, že pokud se podjednotky komplexu ARP2/3 i jeho aktivátorového komplexu SCAR/WAVE exprimují ve stejné oblasti, bude tam komplex ARP2/3 skutečně aktivní. Na rozdíl od ARP2 (Klahre and Chua, 1999) jsou geny pro NAP i PIR exprimovány i v trichomech (Li et al., 2004), což zapadá do předpokládané role komplexu ARP2/3 v jejich morfogenezi.

Pomocí protilátek proti podjednotce ARP3 z kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* (*SpARP3*) byla vizualizována podjednotka ARP3 v izolovaných membránových svlečkách (membrane ghosts) tabákových buněk. Tyto protilátky značily tečkovité a vláknité struktury (Obrázek 15). Tečkovité struktury byly patrné i při značení kontrolním králičím sérem a může se jednat o nespecifické značení. Vláknité struktury připomínaly aktinová filamenta a při dvojité imunolokalizaci s protilátkami proti aktinu a *SpARP3* bylo značení vláknitých struktur překryvné (Van Gestel et al., 2003). Vzhledem k strukturní podobnosti molekul ARP3 a aktinu (Robinson et al., 2001) není vyloučeno, že se jedná o artefakt. Nespecifické značení proteinu ARP3 v extraktech z *arp3* mutantu *Arabidopsis thaliana* protilátkou proti lidskému ARP3 pozoroval

např. Zhang et al. (2013). Protilátka proti podjednotce ARP3 z *Dictyostelium discoideum* (DdARP3) lokalizovala v kořenech kukuřice do oblastí vznikajících kořenových vlásků a plasmodesmat (Van Gestel et al., 2003). I zde se nabízí možnost, že se jedná o arteficiální značení aktinu, který je v těchto strukturách abundantní.

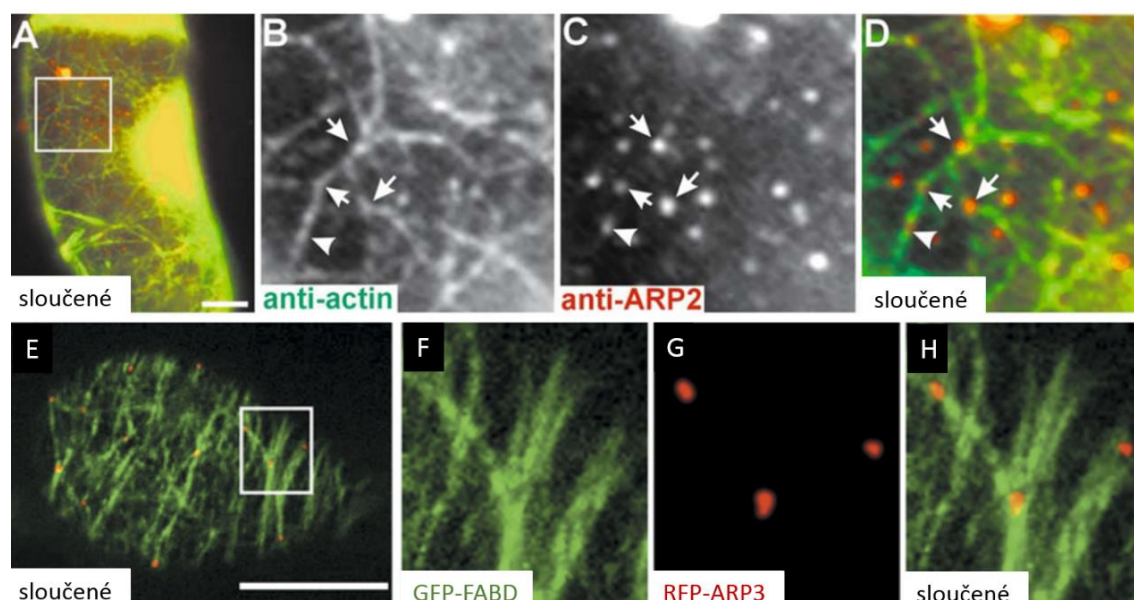


Obrázek 15: Podjednotka ARP3 vizualizovaná pomocí protilátky proti podjednotce ARP3 z poltivé kvasinky (*Schizosaccharomyces pombe*) na izolovaných membránách z tabákových buněk. Protilátka vizualizuje v membránách tečkovité a vláknité struktury (A). Tečkovité struktury jsou částečně patrné i při inkubaci s kontrolním králičím sérem (B). Je vidět, že vláknité struktury vizualizované protilátkou (D) odpovídají částečně vláknům aktinu označených v té samé buňce (C). (upraveno dle Van Gestel et al., 2003) specifita protilátky může být kompromitována strukturální podobností molekul ARP3 a aktinu, jak ukázaly naše pokusy s imunolokalizací v listech *Arabidopsis thaliana* (viz Obrázek 43).

Protilátky proti ARP3 z *D. discoideum* i *S. pombe* značené zlatými kuličkami na řezech kořeny kukuřice shodně značily plasmodesmy na bočních i příčných stěnách buněk a také membránové organely jako ER, neidentifikované kulaté organely, pravděpodobně endosomy a MVB (multi-vesicular bodies) (Van Gestel et al., 2003), což podporuje imunologická detekce podjednotky ARP3 na blotu z membránové frakce buněčných extraktů z BY-2 (Fišerová et al., 2006). Lokalizace v membránových organelách je ve shodě s výsledky, které získali Kotchoni et al. (2009), které nasvědčují tomu, že většina komplexu ARP2/3 po ultracentrifugaci sedimentuje do mikrosomální frakce (pelet), zatímco v supernatantu zůstává pouhých 10 % z celkového množství. V peletu získaném při centrifugaci na 1000 g, který obsahuje hlavně jádra a plastidy, byla pouze malá část a většina signálu byla v peletu získaném při vyšších rychlostech centrifugace (údaje založené na densitometrii signálu na imunoblotu), což je frakce, která odpovídá mikrosomálním membránám. Tyto výsledky, spolu s pokusy s koncentrací solí, detergenty a aktinovými drogami ukázaly, že většina komplexu ARP2/3 je s nejvyšší pravděpodobností periferně asociována s membránami a to nezávisle na F-aktinu. Pro tuto lokalizaci je třeba, aby byl komplex kompletně složený, respektive aby obsahoval podjednotky ARPC2 a ARPC4, ale nemusí být aktivován, neboť mutanti v podjednotkách komplexu SCAR/WAVE neztrácí membránovou lokalizaci (Kotchoni et al., 2009). Imunodetekce po centrifugaci na sacharosovém gradientu navíc ukázala lokalizaci podjednotky ARPC4 do oblastí 32% a 46,5%

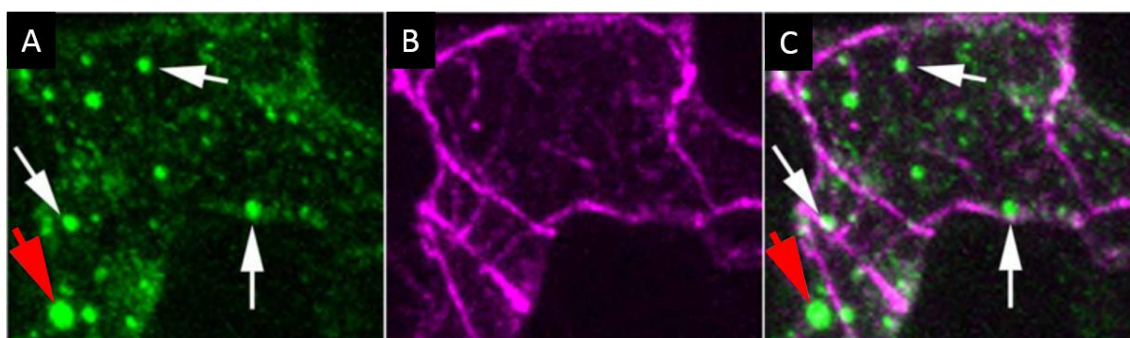
sacharosy, což naznačuje lokalizaci komplexu ARP2/3 do různých membránových organel (Zhang et al., 2013).

Imunolokalizace podjednotek komplexu ARP2/3 pomocí protilátek proti ARP2 a ARP3 ze *S. pombe* v buňkách tabákové suspenze BY-2 ukázala lokalizaci obou podjednotek do teček, které jsou ve většině případů asociované s aktinovými vlákny. Často jsou přímo v místě jejich větvení (Obrázek 16, A-D) (Fišerová et al., 2006), což odpovídá představě o fungování komplexu ARP2/3 v buňce (Robinson et al., 2001). Při chladové depolymeraci aktinu (0 °C) a následné kultivaci při 25 °C byla patrná repolymerace aktinu z oblastí nukleace aktinu (SAN – site of actin nucleation). Dvojitě značení ukázalo, že v těchto místech aktin kolokalizuje právě s podjednotkami ARP2 a ARP3, takže zde komplex zřejmě plní svou úlohu aktinového nukleátoru (Fišerová et al., 2006). Vzhledem k tomu, že se jedná o heterologní protilátky, není zajištěna jejich specifita. Translační fúze ARP3 s RFP umožnila lokalizaci této podjednotky v buňkách suspenze tabáku BY-2 *in vivo*. Ukázalo se, že lokalizace podjednotky je velmi podobná jako při značení protilátkami (Obrázek 16, E-H) – ARP3 tvoří tečky které kolokalizují s aktinovými filamenty a po depolymeraci aktinu chladem či latrunkulinem B, tvoří repolymerační centra (Maisch et al., 2009). V apikálních buňkách řetízků buněk BY-2 bylo signifikantně více teček RFP-ARP3 v apikální, než v distální části, komplex ARP2/3 tam zřejmě hraje roli v ustavení buněčné polarity. Je tedy patrné, že i v téměř nediferencovaných buňkách hraje distribuce komplexu ARP2/3 roli a bylo by proto velmi zajímavé sledovat jeho lokalizaci v kontextu diferencovaných pletiv živých rostlin.



Obrázek 16: Vizualizace podjednotek ARP2 a ARP3 v buňkách tabákové suspenze BY-2. při vizualisaci pomocí protilátek je patrné, že ARP2 tvoří v buňkách tečky, které často asociují s aktinovým cytoskeletem (Fišerová et al., 2006). Velmi podobné výsledky poskytla vizualizace podjednotky ARP3 pomocí fúze s RFP (Maisch et al., 2009).

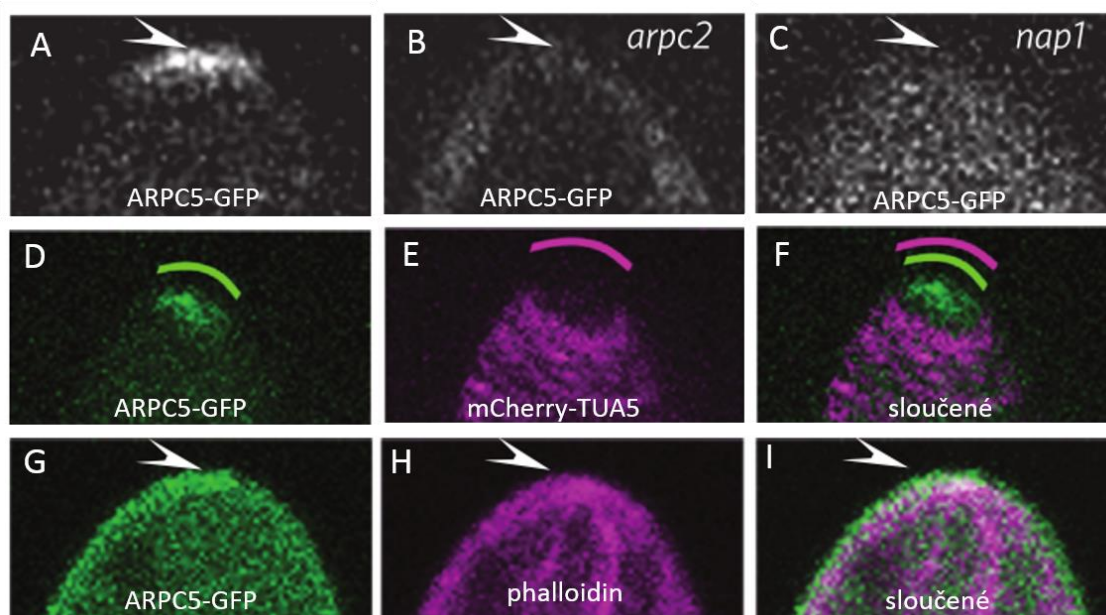
V kontextu diferencovaných pokožkových buněk *Arabidopsis thaliana* sledovali lokalizaci podjednotky ARPC4 Zhang et al. (2013). Ti transformovali rostlinky *arpc4* podjednotkou ARPC4 se značkou HA-tag. Tu následně vizualizovali protilátkami. Transformace ARPC4-HA komplementovala mutaci *arpc4*, takže se zdá, že je značená podjednotka funkční a její lokalizace fyziologicky relevantní, což je podpořeno i použitím endogenního promotoru. Signál lokalizoval nejčastěji do drobných teček rozmístěných v cytoplasmě, v některých případech také do větších teček, které dosahovaly velikosti 1-2 μm (Obrázek 17). Nejvzácněji byl signál pozorován v organelách větších než 2 μm , o kterých autoři předpokládají, že se může jednat o součást GA nebo ER. Zároveň detekovali opakovaně ARPC4-HA v jádře, kde vytvářel jasnou tyčinkovitou strukturu poblíž jádérka. V práci není zmíněna lokalizace v místě laloků pokožkových buněk. Tečky pouze občas kolokalizovaly s aktinovými filamenty. Na druhou stranu při imunolokalizaci v pokožkových buňkách, která zahrnuje mnoho kroků fixace, ošetření detergenty a mrazové drcení, mohou být jemné aktinové struktury rozrušeny a ve výsledku jsou vidět jen nejsilnější aktinové svazky. Není vyloučeno, že *in vivo* byly tečky, které nyní vidíme samostatně, také asociované s aktinovými vlákny. Tečky se objevovaly i u mutantů *sra1*, kteří mají zablokovanou aktivaci komplexu ARP2/3 a vykazují typický *distorted* fenotyp. Z toho vyplývá, že komplex ARP2/3 asociovaný s organelami může být neaktivní (Zhang et al., 2013) což odpovídá pozorováním, které provedli Kotchoni et al. (2009).



Obrázek 17: Imunolokalizace ARPC4-HA v mutantovi *arpc4* (A) a aktinového cytoskeletu (B). Bílé šipky označují tečky o průměru cca 0,5 μm , červená šipka ukazuje na organelu o průměru cca 1 μm (upraveno dle Zhang et al., 2013).

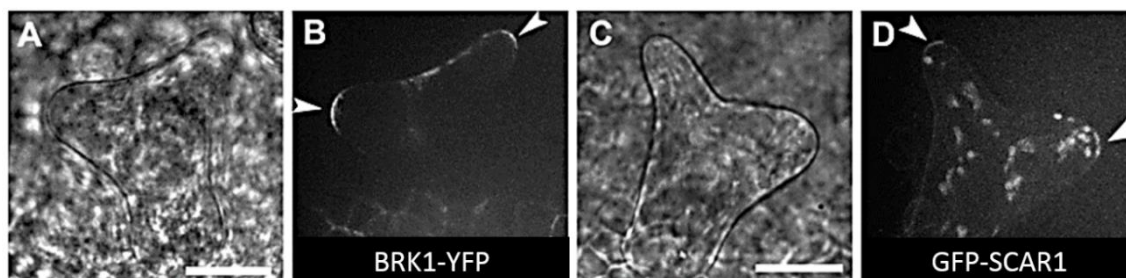
První vizualizaci podjednotek komplexu ARP2/3 *in vivo* v rostlinách *Arabidopsis thaliana* uskutečnili Yanagisawa et al. (2015). Ti fúzovali podjednotku ARPC5 s GFP a ukázali, že lokalizuje do špičky větvi rostoucích trichomů (Obrázek 18, A) Tato lokalizace je závislá na celistvosti komplexu, neboť u mutantu *arpc2* signál ze špičky mizí (Obrázek 18, B). Stejný efekt má i mutace *nap1* (Obrázek 18, C). To zase svědčí o možné roli komplexu SCAR/WAVE v lokalizaci komplexu ARP2/3, podobně jako u *Physcomitrella patens* (Perroud and Quatrano,

2008). Kolokalizace s cytoskeletálními markery ukázala, že ARPC5 ve špičce asociuje s aktinovým maximem, které je umístěno v oblasti bez mikrotubulů (MDZ – microtubule depleted zone). V této práci se bohužel prezentuje pouze lokalizace ARPC5 v rámci trichomů, takže nevíme, jaká byla lokalizace signálu v jiných buňkách. Na rozdíl od prací na BY-2 (Fišerová et al., 2006; Maisch et al., 2009) nezmiňují Yanagisawa et al. žádné tečky asociované s aktinovými vlákny.



Obrázek 18: První publikované pozorování podjednotky komplexu ARP2/3 v živých rostlinách *Arabidopsis thaliana*. ARPC5-GFP lokalizuje do kortikální vrstvy vznikajícího trichomu ve WT (A). v mutantovi *arpc2* (B) či *nap1* (C) tato lokalizace mizí, což by mělo svědčit o nutnosti kompletního aktivovaného komplexu ARP2/3 pro tuto funkci. ARPC5-GFP je lokalizován v místě deplece mikrotubulárního cytoskeletu (D-F) a naopak kolokalizuje s aktinovým maximem, které ve špičce vzniká (G-I) (upraveno dle Yanagisawa et al., 2015).

Translační fúze SCAR1 a BRK1 s GFP a YFP již dříve ukázala lokalizaci těchto podjednotek komplexu SCAR/WAVE do špiček rostoucích trichomových větví (Obrázek 19) (Dyachok et al., 2008), což podporuje představu, že komplex ARP2/3 je zde aktivní a řídí zde formování jemného aktinu nezbytného pro růst větve, jak předpokládají Yanagisawa et al. (2015). Obě podjednotky jsou pravděpodobně membránově vázané, neboť jsou protilátkami detekovány v mikrosomální frakci, dokud nejsou extrakty ošetřeny detergentem (Dyachok et al., 2008), podobně jako podjednotka ARP3 v pokusech, které provedli Kotchoni et al. (2009) z pokusů s mutanty vyplývá, že lokalizace proteinu SCAR1 je závislá na funkci podjednotky BRICK. Kromě lokalizace do špiček větví vykazoval GFP-SCAR1 také asociaci s blíže neurčenými organelami (Dyachok et al., 2008).



Obrázek 19: Lokalizace BRICK a SCAR ve vyvíjejících se trichomech. Fotografie ve světlém poli (A, C) a z konfokálního mikroskopu (B, D). Obě podjednotky komplexu SCAR/WAVE lokalizují do špiček rostoucích větví trichomů (B, D). Kromě toho SCAR1 asociuje s blíže neurčenými organelami (D) (upraveno dle Dyachok et al., 2008).

Přítomnost komplexu ARP2/3 ve špičkách větví rostoucích trichomových větví je dle mého názoru dosud nejlépe podloženou lokalizací komplexu ARP2/3. Pozorování podjednotky ARPC5 fúzované s GFP v živých buňkách je věrohodnější než použití protilátek, které mohou reagovat nespecificky. Navíc je tato lokalizace podpořena stejnou lokalizací BRICK a SCAR1 podjednotek regulačního komplexu SCAR/WAVE (Dyachok et al., 2008). Zůstává však otázkou, jak může takto lokalizovaný komplex ARP2/3 řídit organizaci aktinového cytoskeletu v celém trichomu v takovém rozsahu jaký vidíme na rozdíl mezi WT a mutanty skupiny *distorted* (Obrázek 9).

3 Materiál a metody

3.1 Použitá media

Tabulka 3: Minimální MS medium - pro *Arabidopsis thaliana* (1 L)

MS soli (Sigma M5524)	2,2 g
Sacharosa	10 g
Agar	8 g
pH	5,7

Tabulka 4: YEB medium - pro *Agrobacterium tumefaciens* (1 L)

Meat extract	5 g
Yeast extract	1 g
Pepton	5 g
Sacharosa	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
Agar	17 g

Tabulka 5: LB medium – pro *Escherichia coli* (1 L)

Pepton	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
Agar	17 g

Tabulka 6: MS medium - pro BY-2 (1 L)

MS soli (Sigma M5524)	4,5 g
Sacharosa	30 g
KH ₂ PO ₄	200 mg
Inositol	100 mg
2,4-D	0,2 mg
Thiamin	1 mg
Agar	8 g
pH	5,8

Tabulka 7: MS medium – pro kultivaci *N. benthamiana* (1 L)

MS soli (Sigma M5524)	4,3 g
Thiamin	2,5 mg
Kyselina nikotinová	2,5 mg
Pyridoxin	2,5 mg
Inositol	100 mg
Glycin	10 mg
Kasein	1 g
Sacharosa	30 g
Agar	6 g
pH	5,8

Media byla sterilizována autoklávováním (120 °C, 1,5 kPa, 20 min).

3.2 Kultivace bakterií

Bakterie *Agrobacterium tumefaciens* byly vždy kultivovány na YEB mediu (Tabulka 4) při teplotě 28 °C, bakterie *Escherichia coli* vždy na LB mediu (Tabulka 5) při 37 °C. Kultivace probíhala na pevném mediu v 9cm Petriho miskách v termoboxu, kde byly misky uloženy dnem vzhůru, aby kondenzující voda nerozmývala kolonie, nebo v tekutém mediu v Erlenmeyerových baňkách za stálého míchání na orbitální třepačce při 180 – 200 rpm. Pro selekci byla do medií přidávána antibiotika (Tabulka 8)

Tabulka 8: Používaná antibiotika

Antibiotikum	Selekční konc.	zásobní roztok	Rozpouštědlo	Použití
Kanamycin	50 mg/l	50 mg/ml	Voda	1 µl/ml
Rifampicin	50 mg/l	10 mg/ml	Methanol	5 µl/ml
Tetracyklin	30 mg/l	30 mg/ml	50% ethanol	1 µl/ml
Hygromycin	20 mg/l	20 mg/ml	Voda	1 µl/ml
Spektinomycin	50 mg/l	50 mg/ml	50% DMSO	1 µl/ml
Cefotaxim	100 mg/l	100 mg/ml	voda	1 µl/ml

3.2.1 Izolace plasmidů z *Escherichia coli*

Bakterie *Escherichia coli* nesoucí daný plasmid byly přečárkovány na plotny s LB mediem se selekčními antibiotiky a kultivovány dva dny při teplotě 37 °C. Narostlé kolonie byly zaočkovány do sterilních zkumavek se 3,5 ml tekutého LB media a selekčními antibiotiky a následně kultivovány přes noc za stálého míchání (180 rpm) v teplotě 37 °C. Následující den byly z bakterií izolovány plasmidy pomocí komerčního kitu Wizard plus SV Minipreps Purification System od firmy Promega za použití originálního protokolu. Izolované plasmidy byly zamrazeny a skladovány při teplotě -20 °C.

3.2.2 Příprava elektrokompetentních buněk *Agrobacterium tumefaciens*

Pro přípravu byla použita linie C58C1 s již vneseným plasmidem pSoup, který je potřebný pro expresi plasmidu pGreen (Hellens et al., 2000), ve kterém byly zaklonovány používané geny. Kultura byla rozčárkována na plotny s tuhým YEB mediem se selekčními antibiotiky a kultivována při 28 °C po dobu dvou dnů. Narostlé kolonie byly přeneseny do 10 ml tekutého YEB media se selekčními antibiotiky ve sterilní 100ml Erlenmeyerově baňce a kultivovány přes noc při teplotě 28 °C a za stálého míchání (200 rpm). Poté byly 4 ml bakteriální suspence zaočkovány do 200 ml YEB media s antibiotiky a kultivovány za stálého míchání (200 rpm) a teploty 28 °C až do dosažení optické hustoty suspence 0,6 při vlnové délce 600 nm (OD₆₀₀). Poté se suspence nechala chladit v ledové lázni 15 minut za občasného míchání, následně byla přelita do předchlazených centrifugačních zkumavek a třikrát centrifugována 10 minut při 4000 rpm. Supernatant byl vždy odlit a sediment byl resuspendován ve 200 ml předchlazené destilované vody (4 °C), nakonec byl promytý sediment resuspendován v 10 ml sterilního

10% glycerolu, opět centrifugován a resuspendován v 1 ml sterilního 10% glycerolu. Vzniklá suspence byla po 50 µl přenesena do mikrozkušavek a zamražena v tekutém dusíku. Mikrozkušavky s kompetentními buňkami byly uchovávány při -80 °C.

3.2.3 Transformace bakterií elektroporací

Konzervy elektrokompetentních bakterií se nechaly roztát na ledu a poté byly smíchány s 1 µl roztoku vnášeného plasmidu, se kterým byly 1 minutu inkubovány na ledu. Následovala elektroporace (1950 V, 5 ms). Poté byla k bakteriální suspence přenesena do mikrozkušavky s 1 ml YEB media pokojové teploty a nechala se po dobu tří hodin na třepačce v teplotě 28 °C, aby transformované bakterie zahájili expresi genů resistance vůči selekčním antibiotikům.

3.2.4 Selektce transformovaných bakterií

Po elektroporaci se transformované bakterie vyselektovaly na plotnách s YEB médiem a s příslušnými selekčními antibiotiky. Bakteriální suspence (100 µl) byla rozetřena homogenně po povrchu plotny a kultivována při 28 °C po dobu dvou dnů.

3.2.5 Udržování bakteriálních linií

Bakterie *Agrobacterium tumefaciens* byly krátkodobě uchovávány rozčárkované na plotně s pevným médiem a příslušnými antibiotiky v chladničce při teplotě 8 °C, nebo dlouhodobě v podobě konzervy při teplotě -80 °C.

3.2.5.1 Příprava bakteriálních konzerv

Bakterie byly kultivovány přes noc v tekutém YEB médiu se selekčními antibiotiky. 500 µl narostlé suspence bylo v mikrozkušavce smícháno s 500 µl sterilního 30% glycerolu, promícháno a ihned zamraženo v tekutém dusíku. Bakteriální konzervy byly uchovávány při teplotě -80 °C

Tabulka 9: Vektory použité v práci. ¹SKL = sekvence targetující do peroxisomu, ²HDEL = sekvence targetující do ER, ³MBD = microtubule binding domain, ⁴FABD = fimbrin actin binding domain

Označení	protein	Značí	FP	ATB rostliny	ATB bakterie	Zdroj
GFP-AtARP2	AtARP2	ARP2/3	GFP	Kan	Kan	Sikorová
GFP-AtARP3	AtARP3	ARP2/3	GFP	Kan	Kan	Sikorová
GFP-AtARPC2	AtARPC2	ARP2/3	GFP	Kan	Kan	Sikorová
GFP-AtARPC5	AtARPC5	ARP2/3	GFP	Kan	Kan	Sikorová
iGFP-NtARPC2	NtARPC2	ARP2/3	GFP	Kan	Spe	(Šlajcharová, 2013)
Px-rk	SKL ¹	Peroxisom	mCherry	Kan	Kan	(Nelson et al., 2007)
Px-gk	SKL ¹	Peroxisom	mCherry	Kan	Kan	(Nelson et al., 2007)
Ga-rk	MAN49	GA	mCherry	Kan	Kan	(Nelson et al., 2007)
Er-rk	HDEL ²	ER	mCherry	Kan	Kan	(Nelson et al., 2007)
GFP-fimbrin	FABD ⁴	AF	GFP	Kan	Kan	(Voigt et al., 2005)
GFP-β-tubulin	TUBULIN	MT	GFP	Kan	Kan	(Kumagai, 2001)
RFP-MBD	MBD ³	MT	RFP	Kan	Kan	Bellinvia
mCherry-FABD	FABD ⁴	AF	mCherry	Kan	Kan	Bellinvia
Lifeact-mRFP	Lifeact	AF	mRFP	Kan	spe	(Riedl et al., 2008)

3.3 Kultivace rostlinného materiálu

Mutantní line *Arabidopsis thaliana* použité v práci (Tabulka 10).

Tabulka 10: Linie *Arabidopsis thaliana*

mutace	Pozadí	SALK označení	Zdroj
<i>arp2</i>	Col-0	SALK_077920.56.00.	(Alonso et al., 2003)
<i>arp3</i>	Col-0	SALK_022445.34.70	(Alonso et al., 2003)
<i>arpc2a</i>	Col-0	<i>distorted2-1</i>	D. Szymanski, Purdue University
<i>arpc3</i>	Col-0	SALK_034989.54.00.	(Alonso et al., 2003)
<i>arpc4</i>	Col-0	SALK_013909.27.65	(Alonso et al., 2003)
<i>arpc5</i>	Col-0	SALK_123936.41.55.	(Alonso et al., 2003)

3.3.1 In vitro kultivace *Arabidopsis thaliana* a *Nicotiana benthamiana*

Semínka *Arabidopsis thaliana* byla povrchově sterilizována v 1,5ml mikrozskumavce přidáním 96% ethanolu po dobu jedné minuty. Následovala sterilizace v 1 ml 50% bělidla SAVO (10 minut na třepačce při 1400 rpm). Poté byla semínka čtyřikrát propláchnuta sterilní destilovanou vodou. Pomocí pipety s ustřiženou špičkou pak byla semínka vyseta na minimální MS medium pro *Arabidopsis* (Tabulka 3). Misky byly postaveny pod úhlem cca 80 °. Kultivace probíhala při fotoperiodě 16/8 a teplotě 20 °C. Pro pěstování *Nicotiana benthamiana* byl použit stejný postup a medium pro tabák (Tabulka 7).

3.3.2 Kultivace BY-2

Suspenní buněčná linie tabákových buněk BY-2 byla kultivována v Erlenmeyerových baňkách s 30 ml MS media pro BY-2 (Tabulka 6) za stálého míchání při teplotě 28 °C. Jednou týdně byla kultura pasážována přenesením 1 ml suspence do 30 ml nového media.

3.3.3 Ex vitro kultivace *Arabidopsis thaliana* a *Nicotiana benthamiana*

Ke kultivaci *Arabidopsis thaliana* v podmínkách *ex vitro* byly použity rašelinové tablety Jiffy 7 (<http://www.jiffy.cz/>). Suché tablety byly hydratovány a následně byly rozloženy do sadbovačů. Na povrch byla vyseta semena *Arabidopsis thaliana*. Kultivace probíhala při fotoperiodě 16/8 a teplotě 20 °C. pro pěstování *Nicotiana benthamiana* byl použit stejný postup

3.3.4 Křížení rostlin *Arabidopsis thaliana*

Rostlinky určené ke křížení byly pěstovány *ex vitro* do stadia květenství s prvními květy. Z květu mateřské rostliny, který byl těsně před otevřením, byly ostříhány všechny části kromě pestíku, na bliznu byl následně přenesen pyl z otcovské rostliny. Semena ze zralé šesule byla selektována *in vitro* na mediu s antibiotiky na resistenci obou rodičovských rostlin. Resistentní transformanti byli přeneseni do rašelinových bločků Jiffy a dopěstovány *ex vitro*.

3.4 Transformace rostlinného materiálu

3.4.1 Stabilní transformace *Arabidopsis thaliana* metodou Floral dip

Transformované bakterie byly rozčárkovány na 9cm Petriho misky s YEB médiem se selekčními antibiotiky a kultivovány při teplotě 28 °C. Narostlé kolonie byly přeneseny do Erlenmeyerových baněk s tekutým YEB médiem a selekčními antibiotiky, kde byly kultivovány 1 den za stálého míchání (200 rpm) při teplotě 28 °C. 600 µl suspence bylo zaočkováno do 250 ml YEB media s antibiotiky a následně kultivováno při teplotě 28 °C za stálého míchání (200 rpm) do druhého dne. Vzniklá suspence byla centrifugována 15 minut ve 250ml kyvetě (3700 g, 4 °C) a bakteriální pelet byl resuspendován v 5% sterilním roztoku sacharosy se smáčedlem SILWET v koncentraci 0,05 %. Suspence bakterií byla přenesena do 100ml odměrných válců a stále promíchávána magnetickým míchadlem. Z rostlin *Arabidopsis thaliana* určených k transformaci byly ostříhány všechny již založené šesule a otevřené květy. Takto upravená květenství byla namáčena do suspence *Agrobacterium tumefaciens* po dobu několika vteřin. Po vytažení byly rostliny umístěny do plastových kelímků a zabaleny pomocí potravinové folie SARAN, aby byly udrženy vlhké a bakteriální suspence nezasychala. Zabalené rostliny byly kultivovány ve tmě do druhého dne a poté byly přeneseny do kultivační místnosti (16 hodin světlo, 8 hodin tma, 21 °C) do stadia zralosti. (Metoda vychází z protokolu z práce Zhang et al., 2006)

3.4.1.1 Selektce transformantů *Arabidopsis thaliana*

Přibližně 100 µl semen transformantů bylo po sklizni přeneseno do 2ml mikrozkušavky se sterilizačním roztokem (SAVO a 96% ethanol v poměru 1:5) a bylo sterilizováno 10 minut za stálého promíchávání. Poté byla semena dvakrát promyta 96% ethanolem. Maximum zbylého ethanolu bylo odsáto, semena byla rozprostřena po stěně mikrozkušavky a nechala se vyschnout v laminárním boxu. Poté byla rovnoměrně nasypána na plotny se selekčním médiem. Resistentní transformanti byli přeneseni do rašelinových pelet Jiffy a dále pěstováni *ex vitro* v kultivační místnosti (16 hodin světlo, 8 hodin tma, 21 °C).

3.4.2 Transientní transformace *Arabidopsis thaliana*

Metoda odvozená z metody FAST (Li et al., 2009). Bakterie *Agrobacterium tumefaciens* s konstruktem vnášeným do *Arabidopsis* byly kultivovány na plotnách s YEB médiem a selekčními antibiotiky při 28 °C. Vzniklé kolonie byly přeneseny do Erlenmeyerových baněk s 15 ml tekutého YEB media s antibiotiky a kultivovány přes noc při teplotě 28 °C za stálého míchání (200 rpm). U narostlé suspence byla změřena její optická densita při $\lambda = 600$ nm (OD_{600}). Následně byla část suspence přenesena do 25 ml nového YEB media, tak, aby hodnota OD_{600} byla 0,4. Dále byly bakterie kultivovány za stálého míchání (200 rpm) při teplotě 28 °C po dobu

přibližně 7 hodin, dokud OD₆₀₀ nepřesáhla hodnotu 1,5. Suspense pak byla centrifugována (10 minut, 3000 g) a promyta v 10 ml promývacího roztoku (10mM MgCl₂). Po opakované centrifugaci byl bakteriální pelet resuspendován ve 2 ml promývacího roztoku a vzniklá suspension byla naředěna do kokultivačního roztoku (Tabulka 11) tak, aby vznikly roztoky s OD₆₀₀ v hodnotách 0,3; 0,4; 0,5 a 0,6.

Tabulka 11: Složení kokultivačního roztoku

MS soli	1,1 g/l
Sacharosa	10 g/l
SILWETT	25 µl/l
Acetosyringon	20 µM
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	OD ₆₀₀ = 0,3; 0,4; 0,5; 0,6

Kokultivační roztok byl rozpipetován po 1 ml do jamek ve 12jamkové destičce. Do jamek s jednotlivými roztoky byly po cca deseti kusech přidány čtyřdenní semenáčky *Arabidopsis thaliana*. Kokultivace semenáčků s *Agrobacteriem* probíhala dva dny ve tmě za pomalého míchání na třepačce (cca 50 rpm) při pokojové teplotě. Poté byly semenáčky několikrát propláchnuty sterilním minimálním MS médiem s cefotaximem pro odstranění bakterií *Agrobacterium tumefaciens* a dále byly do druhého dne kultivovány ve sterilním minimálním MS médiu. Posléze byly pozorovány na konfokálním mikroskopu.

3.4.3 Transientní transformace rostlin tabáku infiltrací *A. tumefaciens* do listů

Bakterie s vnášeným konstruktem byly kultivovány na plotnách se selekčními antibiotiky, poté bylo několik kolonií přeneseno do tekutého YEB media se selekčními antibiotiky a byly kultivovány přes noc při teplotě 28 °C za stálého třepání (200 rpm). 2 ml narostlé suspension byly centrifugovány (3000 g, 2 minuty) a dvakrát promyty infiltračním roztokem (Tabulka 12).

Tabulka 12: Složení infiltračního roztoku

MES	10 mM
MgCl ₂	10 mM
Acetosyringon	20 µM
pH	6,5

Po promytí byla suspension v infiltračním roztoku inkubována 3 hodiny při laboratorní teplotě a poté byla injekční stříkačkou vtlačena skrze průduchy na spodní pokožce do mezibuněčných prostor mesofylu tabákových listů. Oblast, kam se dostala suspension, byla na listu patrná podle ztmavnutí a její okraj byl označen pomocí lihového fixu. Rostlinky tabáku s infiltrovanými listy byly kultivovány dva dny v kultivační místnosti (16 hodin světlo, 8 hodin tma, 21 °C) a následně pozorovány na konfokálním mikroskopu.

3.5 Příprava protilátek pro imunolokalizaci

Pro vizualizaci komplexu ARP2/3 pomocí imunolokalizace jsme se rozhodli vytvořit protilátky proti podjednotkám ARPC3 a ARPC5, které jsou na okraji komplexu a protilátky na ně mohou nasedat. Podjednotky s markerem HIS-tag (histidinový hexapeptid) byly exprimovány v bakteriích pod inducibilním promotorem, purifikovány (viz níže) a izolované proteiny byly použity pro imunizaci králíka (Laboratoř biologické kontroly, Fyziologický ústav AVČR). Imunizace probíhala třemi dávkami v třítydenním očkovacím schématu.

3.5.1 Exprese podjednotek značených HIS-tag

Proteiny *AtARPC3* a *AtARPC5* se značkou His-Tag byly natransformovány do bakterií *Escherichia coli*, transformanti byly vyselektováni na LB mediu s antibiotiky. Resistentní kolonie byly přeneseny do 20 ml tekutého LB media se selekčními antibiotiky a kultivovány přes noc při 37 °C za stálého míchání. Druhý den byly přeneseny 3 ml suspence do 450 ml nového LB media se selekčními antibiotiky a bakterie byly kultivovány do dosažení optické hustoty $OD_{600} = 0,35$. Poté byl přidán 1mM IPTG, který indukoval expresi značených podjednotek. Následovala kultivace 3 hodiny při pokojové teplotě a poté byly bakterie sklizeny centrifugací (7000 g, 10 min). Pelet byl uložen na led.

3.5.2 Purifikace pomocí HIS-trap

Následovala izolace značených proteinů podle standardního protokolu ke kitu HisTrap od firmy GE Healthcare. Přítomnost izolovaných proteinů byla ověřena pomocí SDS-PAGE, koncentrace izolovaného proteinu byla stanovena pomocí kitu 2-D Quant Kit od firmy GE Healthcare podle standardního protokolu. Pro imunizaci králíků byl použit 1 µg proteinu na jednu očkovací dávku.

3.6 Proteomická analýza

3.6.1 Izolace proteinů z rostlinného materiálu

Rostlinný materiál byl přenesen do třecích misek předchlazených na -80 °C a zamražen v tekutém dusíku. Poté byl předchlazeným tloučkem rozdrcen na velmi jemný prášek, který byl v předchlazené zkumavce smíchán s extrakčním pufrům (Tabulka 13) a nechal se roztát na ledu. Extrakční pufr byl přidáván v poměru 1:1 k objemu rostlinného materiálu.

Tabulka 13: Složení extrakčního pufru

MES	50 mM
EGTA	10 mM
MgCl ₂	10 mM
Glycerol	2 M
GTP	1 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
Aprotinin	1 µM
Leupeptin	1 µM
Pepstatin	1 µM

Extrakt byl následně centrifugován 15 minut, 3000 g při teplotě 4 °C, pro odstranění zbytků buněčných stěn. Supernatant byl přenesen do nové mikrozkuhavky a byl centrifugován 1 hodinu, 18000 g při teplotě 4 °C. Tím se oddělila rozpustná frakce proteinů (supernatant) a mikrosomální frakce (pelet).

3.6.2 Izolace proteinů z bakterií

Pro izolaci proteinů z bakterií byla bakteriální suspenze centrifugována 5 minut na 10000 g při teplotě 4 °C, Supernatant byl odstraněn a pelet byl smíchán s vysoce denaturujícím pufrem.

3.6.3 SDS-PAGE

Izolované proteiny byly ihned smíchány s vysoce denaturujícím pufrem (Tabulka 14) v těchto poměrech:

45 µl supernatantu + 15 µl vysoce denaturujícího pufru

Pelet z 1 ml rostlinných extraktů + 60 µl vysoce denaturujícího pufru

Pelet z 1 ml bakteriální suspenze + 60 µl vysoce denaturujícího pufru

Tabulka 14: Složení vysoce denaturujícího pufru (1 L)

Tris/Cl	50 mM
SDS	20 g
Močovina	8 M
Glycerol	300 g
Merkaptoethanol	50 ml
Bromfenolová modř	5 g
pH	6,8

Směs proteinů a vysoce denaturujícího pufru byla následně zahřáta na 5 minut na teplotu 95 °C za stálého třepání v termobločku a poté byla nanášena do jamek v gelu. Elektroforéza byla prováděna s použitím 10% nebo 15% polyakrylamidového gelu o velikosti 10,5x11 cm s 2cm vrstvou 4% zaostřovacího gelu (Tabulka 15). Jako velikostní marker byl použit Page Ruler Prestained Ladder od firmy Fermentas v objemu 2 µl na jamku.

Tabulka 15: Složení gelu pro SDS-PAGE

Složka	Zaostřovací gel 4%	Dělicí gel 10%	Dělicí gel 15%
Akrylamid	4%	10%	15%
Bisakrylamid	0,11 %	0,27%	0,4%
Tris /Cl	125 mM	400 mM	400 mM
SDS	0,1 %	0,1 %	0,1 %
AP	0,05 %	0,08%	0,08%
TEMED	0,05%	0,033%	0,033%
pH	6,8	8,8	8,8

Skla pro přípravu elektroforézy byla očištěna 70% ethanolem, po sestavení naplněna dělicím gelem, který byl převrstven destilovanou vodou a 30 minut polymeroval. Poté byla voda odstraněna a dělicí gel byl převrstven 2cm vrstvou zaostřovacího gelu, do které byl zanořen hřeb, který vytváří v gelu jamky pro aplikaci vzorků. Polymerace zaostřovacího gelu trvala 30 minut. Skla s gelem byla svorkami připevněna k elektroforetické aparatuře a do spodní i vrchní komory byl nalit elektroforetický pufr (Tabulka 16). Dělení proteinů probíhalo přibližně jednu hodinu pod napětím 220 V a proudem 40 mA.

Tabulka 16: Složení elektroforetického pufru

Tris/Cl	25 mM
Glycin	0,192 M
SDS	0,1 %

3.6.3.1 Barvení gelů

Po ukončení elektroforézy byl odstraněn zaostřovací gel a dělicí gel s proteiny byl přenesen do barvicího roztoku (Tabulka 17), kde se za stálého míchání na kývačce barvil 1 hodinu.

Tabulka 17: Složení barvicího roztoku

Coomassie brilliant blue R-250	0,25 %
Kyselina octová	10 %
Methanol	40 %

Obarvený gel byl přenesen do odbarvovacího roztoku (Tabulka 18), ve kterém se nechal přes noc za stálého míchání na kývačce. Druhý den byl odbarvovací roztok několikrát vyměněn, dokud nedošlo k úplnému odbarvení pozadí.

Tabulka 18: Složení odbarvovacího roztoku

Ethanol	30 %
Kyselina octová	10 %

3.6.4 Western blot

Po ukončení elektroforézy byl odříznut zaostřovací gel a dělicí gel s proteiny byl přenesen do blotovadla na PVDF membránu aktivovanou ponořením do methanolu. Membrána s gelem byly vloženy mezi 3 vrstvy filtračních papírů (Whatmann 3 mm) nasáklých transferovým pufrem (Tabulka 19). Po odstranění bublin pomocí skleněného válečku a přiklopení víka blotovadla proběhl transfer proteinů na membránu. Přenos trval 1 hodinu u 10% gelů a 2 hodiny u 15% gelů při napětí 6 V a proudu 300 mA

Tabulka 19: Složení transferového pufru

Tris/Cl	100 mM
Glycin	180 mM
Methanol	20 %
pH	8,3

Membrána s přenesenými proteiny byla následně vložena do TBS pufru (Tabulka 20) s 4% sušeným kravským mlékem pro zablokování nespecifických epitopů. Blokování probíhalo 2 hodiny za stálého míchání na kývačce při teplotě 37 °C. Po blokování byla membrána přenesena do roztoku primární protilátky (Tabulka 21) v TBS pufru, kde byla za stálého míchání na kývačce inkubována 2 hodiny při pokojové teplotě nebo přes noc v 8 °C. poté byla membrána třikrát 10 minut omyta TBS pufrem a následně přenesena do roztoku sekundární protilátky (Tabulka 22), se kterou byla inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě za stálého míchání na kývačce. Po kultivaci se sekundární protilátkou byla membrána opláchnuta třikrát 10 minut v TBS pufru a následně vizualizována pomocí detekčního systému ECL.

Tabulka 20: Složení TBS pufru

Tris/Cl	20 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	1 %
pH	7,4

3.6.5 ECL – enhanced chemiluminescence

Pro zobrazení proteinu na membráně byla použita chemiluminiscenční metoda (ECL). Sekundární protilátka označená křenovou peroxidázou (HRP) byla vizualizována pomocí kitu ECL Western blotting detection reagents and analysis system od firmy Pierce. Membrána byla vyjmuta z TBS pufru a přenesena na jednu minutu do vyvolávacího roztoku, poté byla vložena mezi dvě vrstvy folie a spolu s rentgenovým filmem uzavřena do expoziční kazety. Expozice trvala 1-10 minut a poté byl film vyvolán ponořením na 1-2 minuty do vývojky pro RTG materiál, opláchnut vodou a ustálen 10 minut v ustalovači. Poloha proužků byla konfrontována s velikostním markerem Page ruller na původní membráně.

Tabulka 21: Primární protilátky použité při western blotu

Interakce	Zdroj	Zvíře	Ředění	Výrobce
Anti-GFP	<i>A. victoria</i>	Králík	1:1000	Invitrogen
Anti-ARPC3	<i>A. thaliana</i>	Králík	1:5000	Vlastní
Anti-ARPC5	<i>A. thaliana</i>	Králík	1:5000	Vlastní

Tabulka 22: Sekundární protilátky použité při western blotu

Interakce	Marker	Ředění	Výrobce
Anti-rabbit	HRP	1:2000	Enzo

3.7 Imunolokalizace proteinů v rostlinách

Výsledky získané vizualizací podjednotek komplexu ARP2/3 pomocí fúze s fluorescenčním proteinem jsme se rozhodli ověřit pomocí protilátek (Tabulka 23,

Tabulka 24).

Tabulka 23: Primární protilátky používané při imunolokalizaci podjednotek komplexu ARP2/3

Protilátka	Zdroj	Mono/poly	Zvíře	Ředění	Výrobce
Anti-ARP2	Kvasinka	Polyklonální	Králík	1:1000	K. Gould
Anti-ARPC2	Tabák	Polyklonální	Králík	1:1000	Vlastní
Anti-ARP3	Člověk	Polyklonální	Koza	1:200	SC Biotech.
Anti-aktin	Kuře	Monoklonální	Myš	1:400	ICN
Anti-tubulin	Kuře	Monoklonální	Myš	1:1000	Sigma

Tabulka 24: Sekundární protilátky používané při imunolokalizaci podjednotek komplexu ARP2/3

protilátka	marker	ředění	zdroj
Anti-rabbit	Alexa 488	1:1000	Invitrogen
Anti-goat	FITC	1:200	Sigma
Anti-mouse	Alexa 555	1:1000	Invitrogen

3.7.1 Imunolokalizace v kořenech

Pro imunolokalizaci cytoskeletálních proteinů byly použity 5-7 dní staré semenáčky *Arabidopsis thaliana*. Jednotlivé kroky fixace byly prováděny v jamkách 12jamkové kultivační des-
tičky, mezi kterými se rostliny přenášely v košíčkách se dnem z nylonové tkaniny. Na jednu jamku je třeba 2 ml roztoku, aby byly rostlinky v košíčku ponořené. Mezi jednotlivými kroky byl z košíčků odsáván předchozí roztok přiložením na vrstvu papírových utěrek. Kořínky se-
menáčků byly odříznuty žiletkou a byly v košíčku přeneseny na 40 minut do prvního fixačního roztoku. Poté byly přeneseny do druhého fixačního roztoku a fixovaly se 40 minut při sníže-
ném tlaku (600 hPa). Následovalo promytí dvakrát 5 minut promývacím roztokem a 10 minut inkubace s detergenčním roztokem s Tritonem X-100, následovaná opětovným promytím dvakrát 5 minut v promývacím roztoku. Následovala 40 minut dlouhá inkubace v enzymač-
ním roztoku s celulasou a pektolyasou Y-23. Poté byly kořínky promyty třikrát 5 minut v ASB

a na 10 minut přeneseny do mrazáku do methanolu vychlazeného na -20 °C. Dalším krokem bylo 30 minut dlouhé blokování v blokovacím roztoku s 1% BSA. Takto připravené kořínky byly následně inkubovány s primární protilátkou přes noc v lednici (8 °C) nebo 4 hodiny při pokojové teplotě. Před přidáním sekundární protilátky byly kořínky promyty třikrát 10 minut blokovacím roztokem. Inkubace se sekundární protilátkou byla prováděna po 4 hodiny při pokojové teplotě. Po inkubaci se sekundární protilátkou byly kořínky promyty třikrát 10 minut PBS a pozorovány pod konfokálním mikroskopem.

3.7.1.1 Složení roztoků pro imunolokalizaci v kořenech *Arabidopsis thaliana*

ASB – actin stabilising buffer

PIPES	100 mM
MgCl ₂	5 mM
EGTA	10 mM
pH	6,4

Fixační roztok 1

ASB	1x
MBS	400 µM
Triton X-100	0,05 %

Fixační roztok 2

Fixace 1	1x
Formaldehyd	2%
Glutaraldehyd	0,035%

Promývací roztok

ASB	1x
Triton X-100	0,1%

Detergenční roztok

ASB	1x
Triton X-100	1%

Enzymační roztok

ASB	1x
BSA	1%
Pektolyasa Y-23	0,5%
Celulasa	0,5%
Leupeptin	10 µM
Pepstatin	1,25 µM
PMSF	300 µM

Blokovací roztok

PBS	1x
BSA	1%
Triton X-100	0,05%
Glycin	50 mM

3.7.2 Imunolokalizace v listech

Děložní lístky ze semenáčků *Arabidopsis thaliana* pěstovaných 7 dní na vertikálních miskách s minimálním MS médiem byly odříznuty žiletkou a přeneseny do košíčků se dnem z nylonové tkaniny, ve kterých byly přeneseny do jamky s prvním fixačním roztokem s obsahem MBS, ve kterém byly fixovány 20 minut. Ve druhém fixačním roztoku s formaldehydem byly fixovány 60 minut a pak byly dvakrát 10 minut promyty promývacím roztokem. Následně byl celý košíček i s lístkou ponořen do tekutého dusíku, zmrzlé lístky byly pak přímo v košíčku rozlámány na kousky pomocí vymražené skleněné tyčinky. Fragmentované lístky byly přeneseny do detergentního roztoku, ve kterém byly inkubovány 60 minut za stálého míchání na orbitální třepače. Poté byly na dvacet minut přeneseny do enzymatického roztoku s pektolysou Y-23 a následně třikrát 10 minut promyty promývacím roztokem. Po třicetiminutové inkubaci v blokovacím roztoku s BSA následovala inkubace s primární protilátkou, která trvala 4 hodiny při pokojové teplotě nebo přes noc v lednici (8 °C). Následovalo promytí třikrát 10 minut v PBS a inkubace se sekundární protilátkou po dobu 4 hodiny při pokojové teplotě nebo přes noc v lednici (8 °C). Po inkubaci se sekundární protilátkou byly lístky promyty třikrát 10 minut v PBS a pozorovány pod konfokálním mikroskopem.

3.7.2.1 Složení roztoků pro imunolokalizaci v děložních listech *Arabidopsis thaliana*

ASB – actin stabilising buffer

PIPES	100mM
MgCl ₂	4mM
EGTA	10mM
pH	6,9

Fixační roztok 1

ASB	1x
MBS	400 µM
Triton X-100	0,05 %

Fixační roztok 2

ASB	1x
MBS	400 µM
Triton X-100	0,05 %
Formaldehyd	2%
Glutaraldehyd	0,035%

Promývací roztok

ASB	1x
Triton X-100	0,05%

Detergenční roztok

PBS	1x
Triton X-100	0,1%

Enzymační roztok

ASB	1x
Pektolyase Y-23	0,1%
Triton X-100	0,05%

Blokovací roztok

PBS	1x
BSA	1%
Triton X-100	0,05%
Glycin	50mM

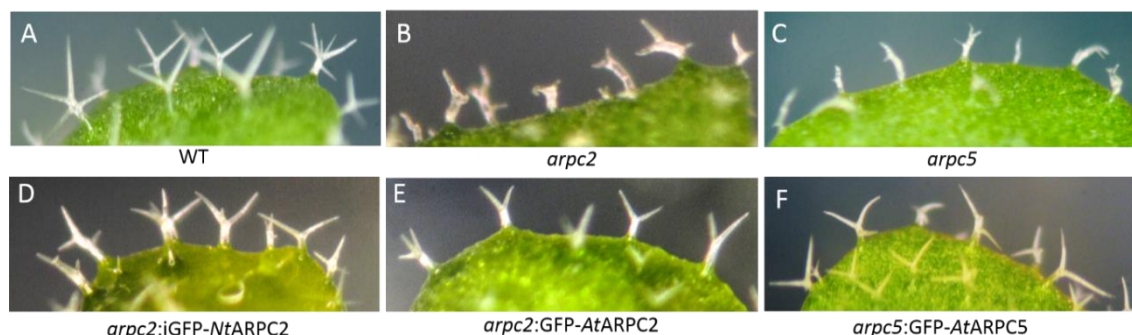
4 Výsledky

4.1 Vizualizace podjednotek komplexu ARP2/3 pomocí fúze s GFP

Pro vizualizaci podjednotek komplexu ARP2/3 v živých buňkách byly mutantní rostliny *Arabidopsis thaliana* postrádající některou z podjednotek stabilně transformovány chybějící podjednotkou translačně fúzovanou s GFP.

4.1.1 Transformace komplementuje mutantní fenotyp

Konstrukty kódující fúzní proteiny 35S::GFP-AtARP2, 35S::GFP-AtARP3, 35S::GFP-AtARPC2A, 35S::GFP-AtARPC3, 35S::GFP-AtARPC4 a 35S::GFP-AtARPC5 byly transformovány do mutantů *Arabidopsis thaliana* *arp2*, *arp3*, *arpc2*, *arpc3*, *arpc4* a *arpc5*. Úspěšnost transformace byla opakovaně velmi nízká, navíc bylo zjištěno, že některé mutantní linie udržují kanamycinovou resistenci po T-DNA mutagenезi, která je nekompatibilní se stávajícími vektory, které též nesou kanamycinovou resistenci. Podařilo se proto vytvořit pouze varianty *arpc2*:GFP-AtARPC2 a *arpc5*:GFP-AtARPC5. Takto transformované mutantní rostliny vykazovaly komplementaci fenotypu deformovaných (distorted) trichomů (Obrázek 20). Z toho důvodu se lze domnívat, že podjednotky fúzované s GFP mohou v rostlinných buňkách tvořit komplex, který je pak schopný plnit svou funkci. Komplementace mutace byla pozorována i u mutantů *arpc2* transformovaných tabákovou podjednotkou *NtARPC2* fúzovanou s GFP (Šlajcherová, 2013), které byly v této práci také využívány. Exprese *NtARPC2* v rostlinách *Arabidopsis* je řízena promotorem indukovatelným β -estradiolem, proto je fúzní protein v této práci nazýván iGFP-*NtARPC2*. V tomto případě záleželo na míře indukce exprese. Rostlinky *arpc2*:iGFP-*NtARPC2* pěstované na mediu s 2 μ M β -estradiolem vykazovaly komplementaci jen u prvního pravého listu, při koncentraci 20 μ M už docházelo ke komplementaci u všech pravých listů.

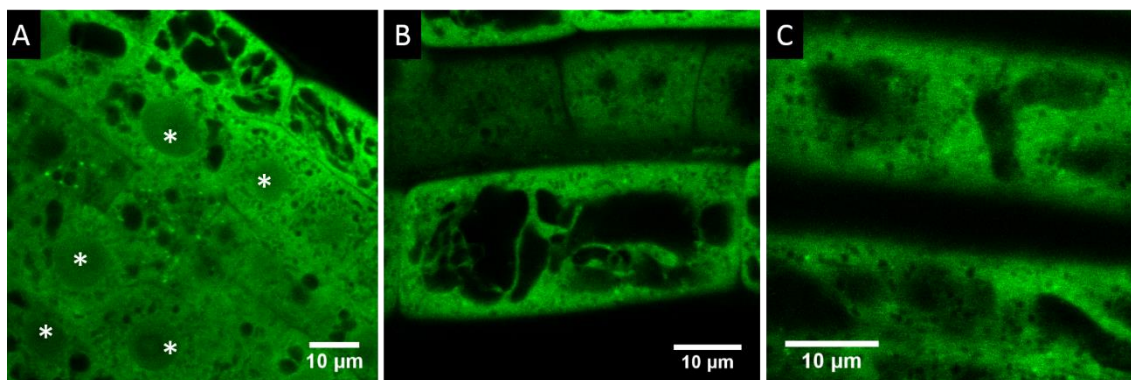


Obrázek 20: Komplementace fenotypu mutantů *arpc2* a *arpc5* po transformaci fúzními proteiny. Mutanti *arpc2* a *arpc5* mají typické pokroucené trichomy (B, C). Po transformaci těchto mutantů chybějící podjednotkou fúzovanou s GFP došlo ke komplementaci mutace (E, F) a to i v případě že se jednalo o tabákovou podjednotku (D)

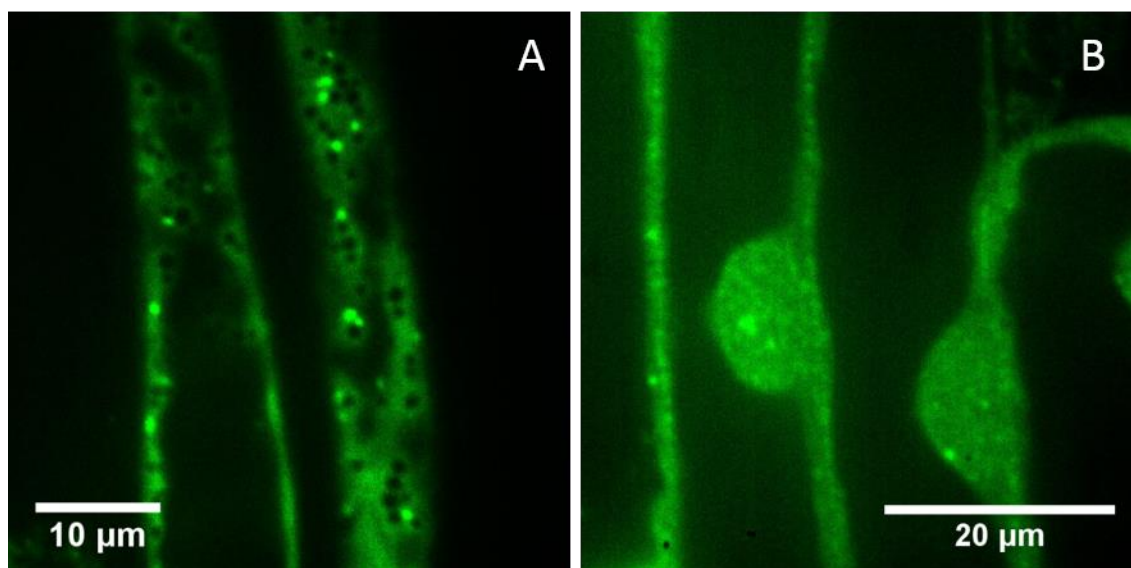
Tento výsledek lze pravděpodobně přičítat nízkému transportu β -estradiolu z média do nadzemních částí rostliny. Přidání kapky 20 μ M β -estradiolu přímo do listové růžice *ex vitro* rostoucích rostlinek *arpc2::iGFP-NtARPC2* vedlo také ke komplementaci mutantního fenotypu, což tuto hypotézu podpořilo.

4.1.2 Lokalizace podjednotek v živých buňkách

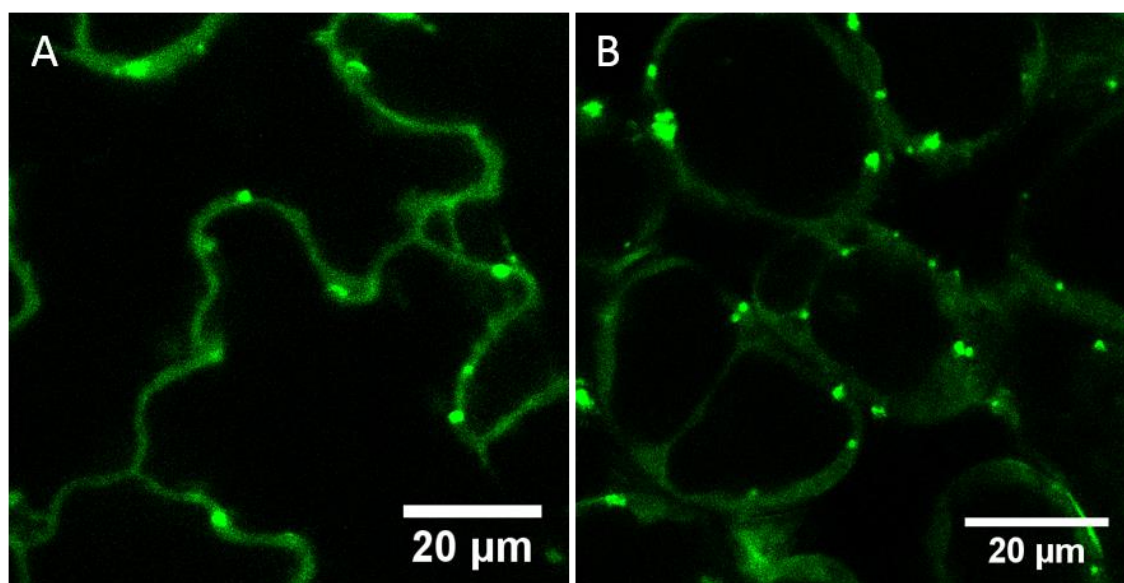
5-7 dní staré semenáčky transformovaných rostlin byly pozorovány pod fluorescenčním konfokálním mikroskopem. Všechny tři exprimované proteiny vykazovaly v buňkách stejnou lokalizaci. Kromě difusního cytoplasmatického signálu byla vidět také přítomnost proteinů v jádře a nejpřekvapivější byla lokalizace fluorescenčního signálu do jasných teček, které se v buňkách pohybovaly. Některé oscilovaly dlouhodobě na jednom místě, některé se pohybovaly rychlostí až 5-10 μ m/s (nejrychlejší byl pohyb v elongovaných buňkách kořene a hypokotylu), případně mezi těmito stavy přecházely (Obrázek 25). V kořenové špičce převládal cytoplasmatický signál (Obrázek 21), v elongované části kořene cytoplasmatický signál slábl a zesiloval signál v tečkách a v jádře (Obrázek 22, A). V kořenové špičce je jaderný signál nižší než cytoplasmatický (Obrázek 21, A) zatímco v elongovaných buňkách kořene je silnější (Obrázek 24). Jasné tečky byly patrné i v kořenových vláscích, buňkách hypokotylu a v pokožkových a mezofylových buňkách děložních lístků (Obrázek 23).



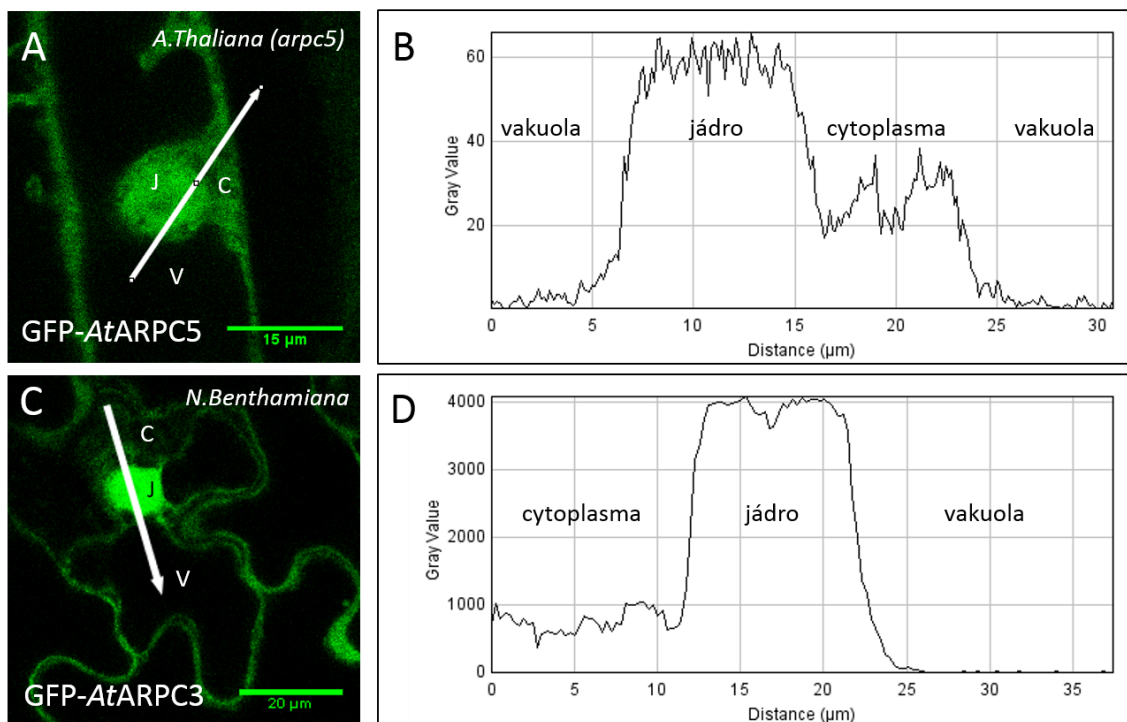
Obrázek 21: Signál iGFP-*NtARPC2* v kořenu rostlin *arpc2*. Signál v meristému kořenové špičky (A). Signál v transientní zóně - optický řez středem buňky (B) a kortikální vrstvou (C). Jádra označena hvězdičkou.



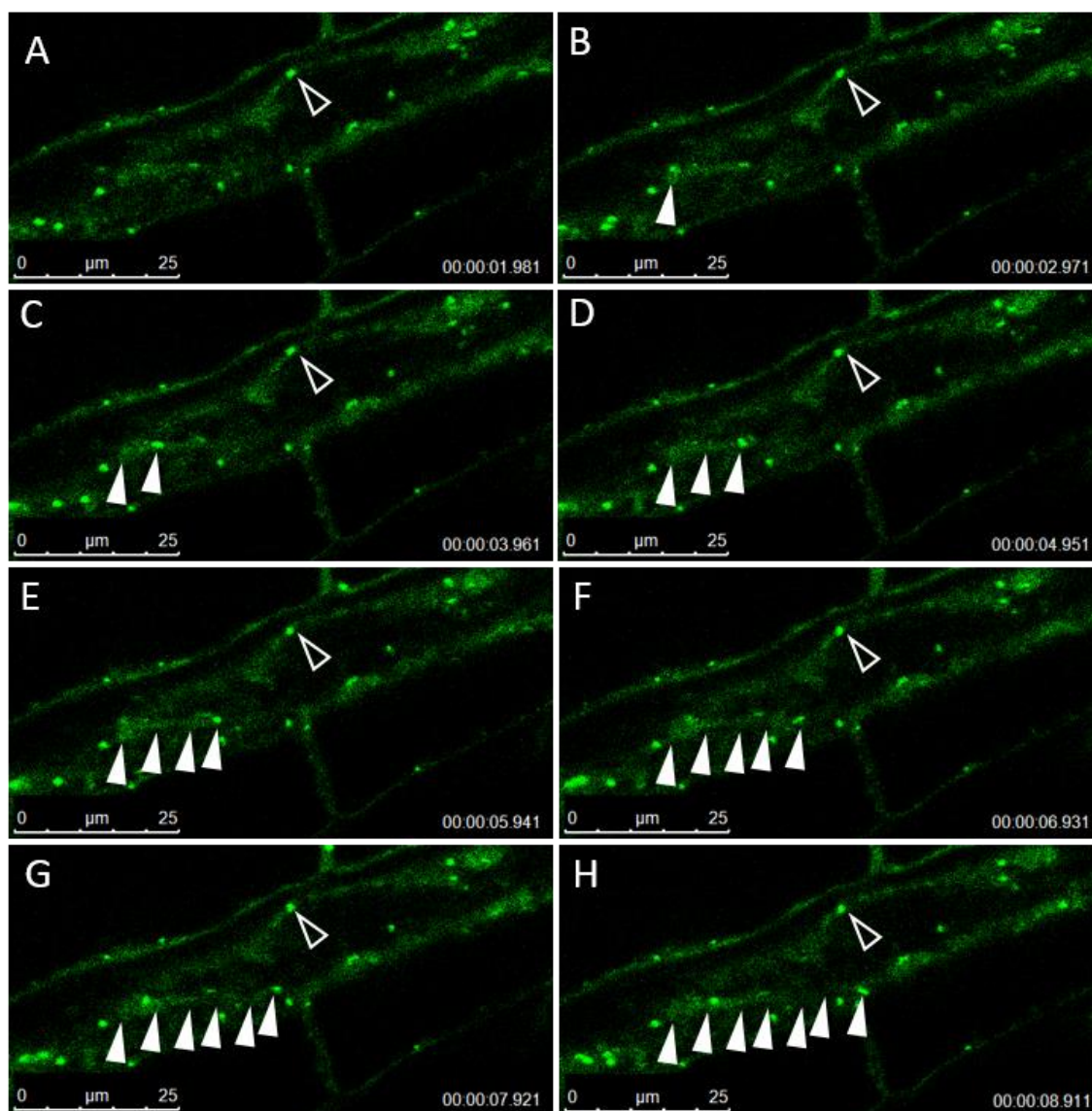
Obrázek 22: Signál iGFP-*NtARPC2* v rostlinách *arpc2* - optický řez kortikální vrstvou (A) a středem buňky (B) rhizodermis elongační zóny kořene. Je patrný nárůst signálu v tečkách ve srovnání s cytoplasmatickým signálem. V cytoplasmatickém signálu jsou vidět negativně značené organelly (A). Difusní signál iGFP-*NtARPC2* je přítomen v jádře, na spinning disc mikroskopu jsou v jádře výjimečně patrné i jasné tečky (B).



Obrázek 23: Signál iGFP-*NtARPC2* v děložních lístcích mutantu *arpc2*: buňky spodní pokožky (A) a mesofylové buňky (B)



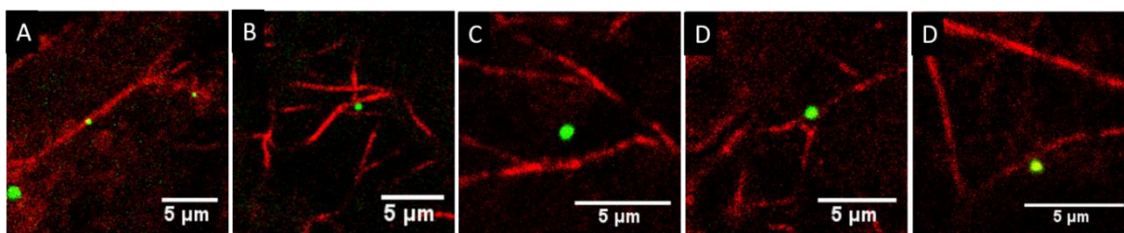
Obrázek 24: Síla signálu GFP-AtARPC5 je v jádře kořenové buňky mutantu *arpc5* silnější než v cytoplasmě (A), podle měření v programu FIJI (Schindelin et al., 2012) je fluorescence v jádře cca dvakrát intenzivnější než v cytoplasmě (B). v transientně transformovaných pokožkových buňkách *N. benthamiana* je v jádře signál dokonce cca čtyřikrát silnější než v cytoplasmě (C, D). Šipky v obrázcích odpovídají ose x na grafu intensity. Intenzita fluorescence je vynesena na ose y. J = jádro, V = vakuola, C = cytoplasma. Zobrazeny jsou reprezentativní optické řezy z konfokálního mikroskopu.



Obrázek 25: Pohyblivost teček tvořených iGFP-*NtARPC2* v kořenových buňkách rostlin *arpc2*. některé tečky se pohybují velmi rychle s cytoplasmatickým prouděním (plná šipka), některé oscilují na místě (prázdná šipka). Mezi těmito stavy mohou přecházet. Časový krok 990 ms, Rychlost zobrazené pohybující se tečky je 5,04 $\mu\text{m/s}$.

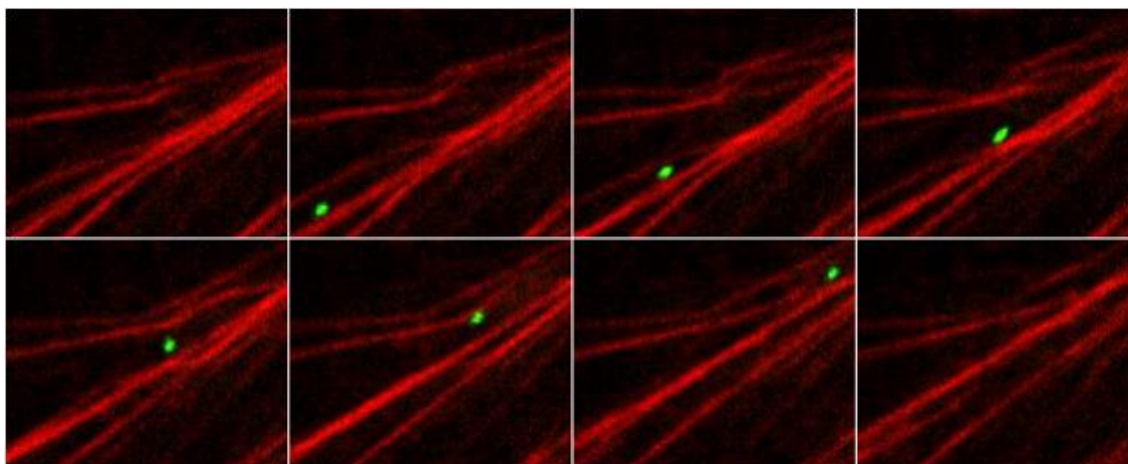
4.1.3 Kolokalizace s cytoskeletem

Vzhledem k známé funkci komplexu ARP2/3 jak nukleátoru aktinového cytoskeletu jsme se rozhodli vizualizovat v buňkách současně podjednotky komplexu ARP2/3 s cytoskeletálními markery. První pokusy s vizualizací aktinového cytoskeletu pomocí protilátek ve fixovaných buňkách rostlin *arpc2::iGFP-NtARPC2* ukázala, že tečky skutečně v mnoha případech kolokalizují s aktinovými vlákny, ne však vždy (Obrázek 26). Často se zdá, že jsou tečky laterálně asociované s vláknem, nebo se nachází v jeho bezprostřední blízkosti, nicméně signál není ve většině případů přímo součástí vlákna. To by však mohl být artefakt vznikající při fixaci vzorku při imunolokalizaci.



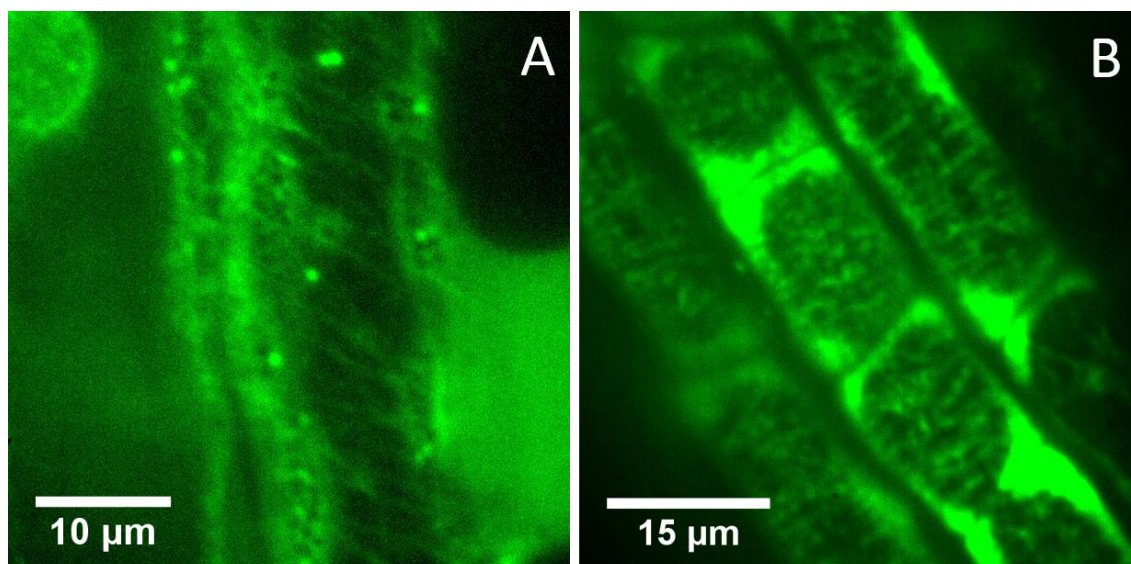
Obrázek 26: Imunolokalizace aktinu v pokožkových buňkách děložních lístků rostlinek *arpc2*:iGFP-*NtARPC2* ukazuje, že v některých případech tečky značené podjednotky ARPC2 asociují s aktinem. Primární protilátka: myší-anti-aktin, sekundární protilátka: anti-myší-alexa555.

Pozdější pozorování v živých buňkách však tato pozorování potvrdilo. V rostlinkách *arpc2*:GFP-*AtARPC2* transientně transformovaných aktinovými markery lifeact-mRFP nebo mCherry-FABD bylo patrné, že tečky se skutečně pohybují podél aktinových kabelů, pravděpodobně pomocí myoinových motorů (Obrázek 27). Stejně jako u imunolokalizace i *in vivo* je patrné, že tečky k aktinovému kabelu zcela nepřiléhají a mezi oběma strukturami je zřetelná mezera.

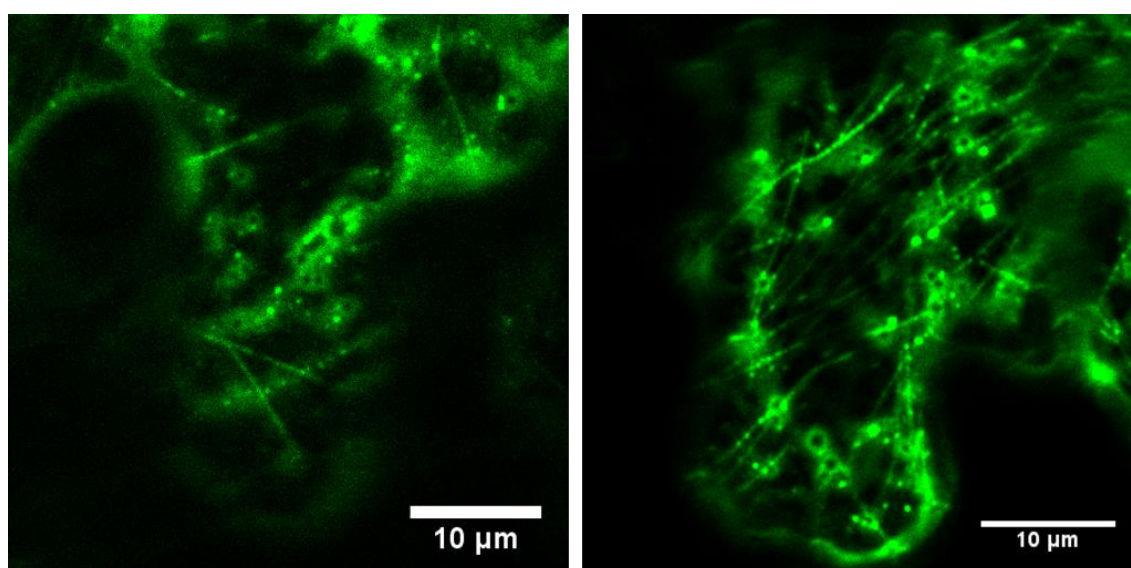


Obrázek 27: Pohyb teček GFP-*AtARPC2* podél aktinu značeného lifeact-mRFP. Rostlina *arpc2* stabilně expimující GFP-*AtARPC2* transientně transformovaná lifeact-mRFP.

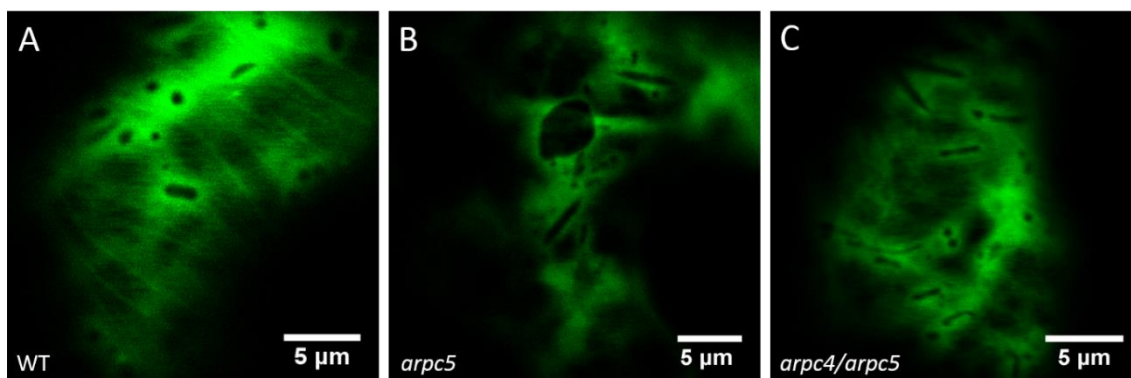
V některých případech bylo pozorováno, že podjednotka ARPC2 značila v buňkách vláknité struktury. Tento projev byl výjimečně pozorován v kořenových buňkách semenáčků *arpc2*:iGFP-*NtARPC2* pěstovaných na mediu s 20 μM β-estradiolem (Obrázek 28) a v rostlinkách transientně transformovaných konstruktem iGFP-*NtARPC2* (Obrázek 29). Pozdější kolokalizace s markery pro cytoskelet (mCherry-FABD, TUA5-RFP) odhalila, že se překvapivě nejedná o aktinová vlákna, ale o mikrotubuly (Obrázek 31). Dále se zdá, že v mutantním pozadí ke tvorbě vláken nedochází nebo je jejich tvorba omezena (Obrázek 30).



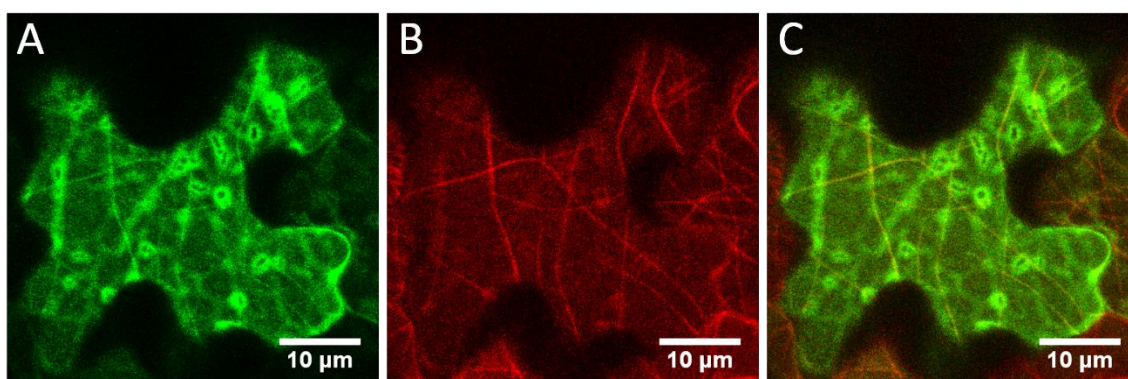
Obrázek 28: iGFP-*NtARPC2* v kořenových buňkách rostlin *arpc2* výjimečně značil mikrotubulární cytoskelet - buňky rhizodermis prodlužovací zóny (A) a křenové čepičky (B).



Obrázek 29: Mikrotubulární cytoskelet byl zřetelně značen při transientní expresi iGFP-*NtARPC2* v děložních lístcích mutantů *arpc2*.

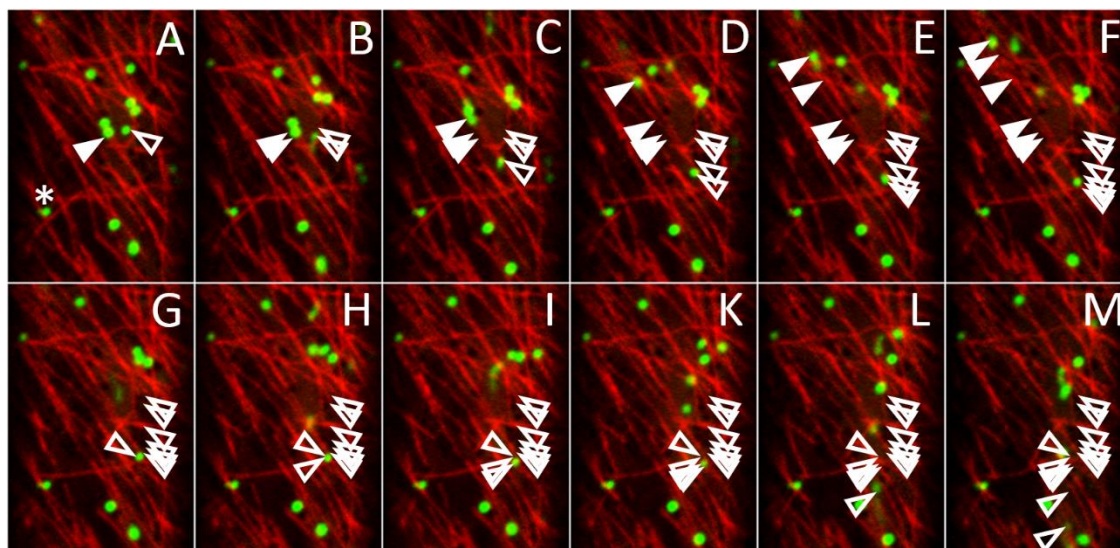


Obrázek 30: Vlákna v buňkách WT (A), mutanta *arpc5* (B) a dvojitého mutanta *arpc4/arpc5* (C) natransformovaných transientně proteinem iGFP-*NtARPC2*. indukováno 20μM β-estradiolem. Zdá se, že v mutantním pozadí ke značení mikrotubulů nedochází, nebo je jejich značení omezené.



Obrázek 31: Transientní transformace konstruktu iGFP-*NtARPC2* (A) do rostlin exprimujících TUA5-RFP (B) ukazuje, že iGFP-*NtARPC2* značí při transientní expresi v buňkách mikrotubulární cytoskelet (C)

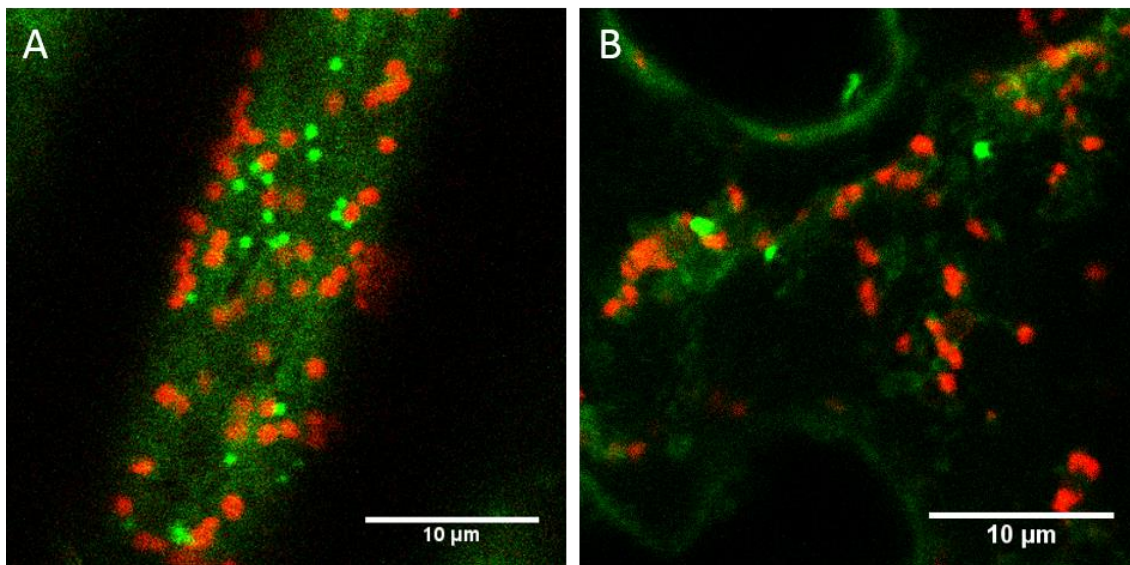
Proto jsme se rozhodli pozorovat interakci mikrotubulárního cytoskeletu s tečkami ve stabilně transformovaných rostlinách. V buňkách křížence iGFP-*NtARPC2* x RFP-TUA5 bylo zřejmé, že tečky se pohybovaly většinou nezávisle na mikrotubulárním cytoskeletu. Maximum pohybu teček probíhalo v hlubší vrstvě cytoplazmy, dále od buněčné stěny, většinou ve směru shodném s osou růstu buněk. V kortikální vrstvě, ve které byly přítomny mikrotubuly, bylo teček méně. Ačkoli byl jejich pohyb většinou zjevně řízen aktinovými vlákny, v některých případech zdánlivě zastavily v asociaci s mikrotubulárním vláknem a výjimečně se i pohybovaly podél mikrotubulů. (Obrázek 32). Tyto výsledky naznačují, že ačkoli se tečky pohybují primárně podél aktinových filament (Obrázek 27), minimálně v případě iGFP-*NtARPC2* mohou interagovat i s mikrotubulárním cytoskeletem.



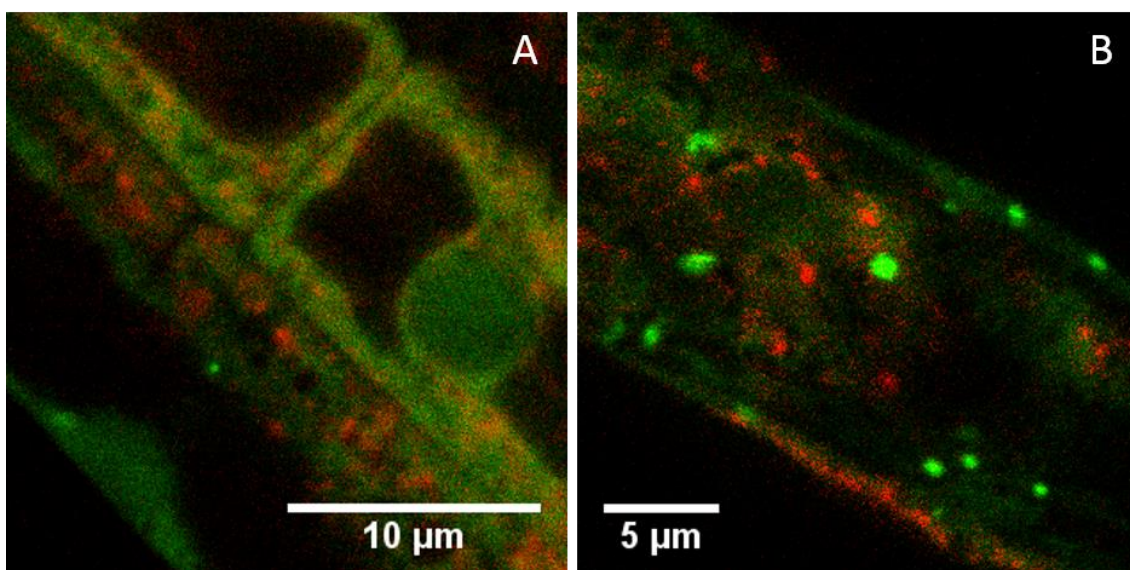
Obrázek 32: Kolokalizace iGFP-*NtARPC2* s mikrotubuly (RFP-TUA5). Přesto, že většina teček se pohybuje nezávisle na mikrotubulech, některé se zdají být na ně navázané (hvězdička). Některé tečky se pohybují nezávisle na mikrotubulech (prázdné šipky) ale mohou se na nich dočasně zastavit (F-K) a poté pokračovat (L, M). Některé tečky se dokonce výjimečně pohybují podél mikrotubulů (plné šipky, A-F). Časový krok 5,1 s, (kříženec rostlin *arpc2*:iGFP-*NtARPC2* a WT:RFP-TUA5).

4.1.4 Kolokalizace s dalšími organelami

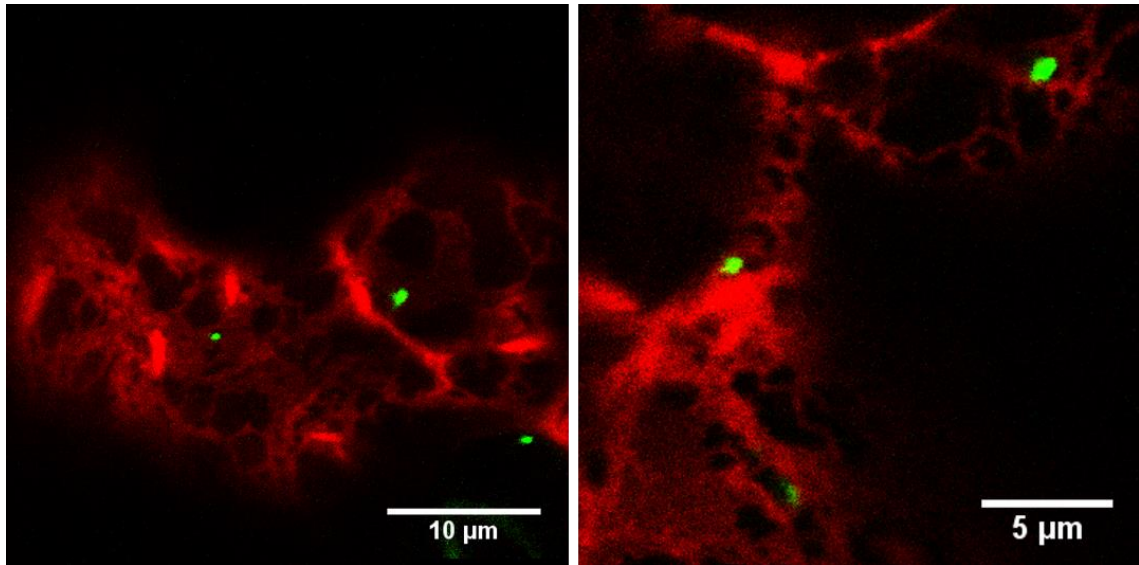
Pro odhalení identity teček značených našimi konstrukty byla provedena kolokalizační studie s markery pro několik kandidátních organel. Jako nejpravděpodobnější se jevila možnost, že podjednotky ARP2/3 komplexu asociují s dictiosomy Golgiho aparátu, které mají podobný tvar, velikost a pohybují se podobným způsobem označovaným jako stop-and-go (Nebenführ et al., 1999). Kříženci *arpc2*:iGFP-*NtARPC2* s rostlinami exprimujícími marker pro GA (MAN49-mCherry) však neukázaly žádnou kolokalizaci těchto struktur (Obrázek 33). Stejně tak kříženec *arpc2*:iGFP-*NtARPC2* s rostlinami exprimujícími marker pro TGN (mCherry-RAB14A) neukázal žádnou kolokalizaci (Obrázek 34). Tečky nekolokalizovaly ani s endoplasmatickým retikulem označeným markerem HDEL-mCherry (Obrázek 35). Teprve kolokalizace s markerem pro peroxisomy (mCherry-SKL) ukázala asociaci teček s peroxisomy (Obrázek 37). Tyto tečky asociované s peroxisomy, obsahující minimálně dvě podjednotky komplexu ARP2/3, jsme se rozhodli pracovníně pojmenovat arposom.



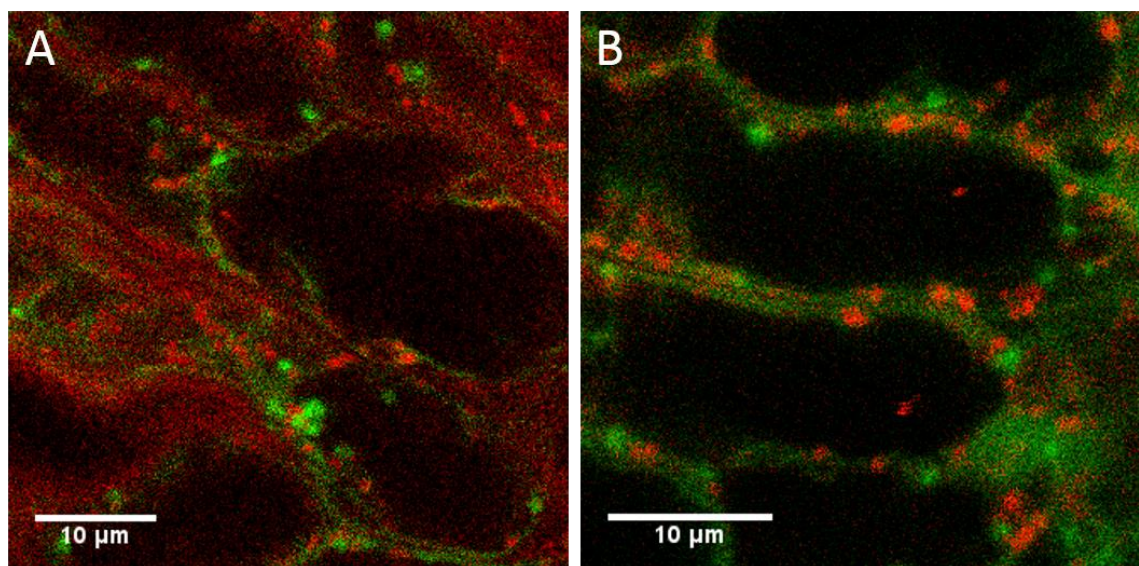
Obrázek 33: Kolokalizace signálu iGFP-*NtARPC2* a markeru pro GA (MAN49-mCherry) v rostlinách *arpc2*. Buňka rhizodermis (**A**) a buňka spodní pokožky děložního lístku (**B**). Oba markery tvoří podobné motilní tečky, které ale nijak nekolokalizují. (kříženec rostlin *arpc2*:iGFP-*NtARPC2* a WT:MAN49-mCherry)



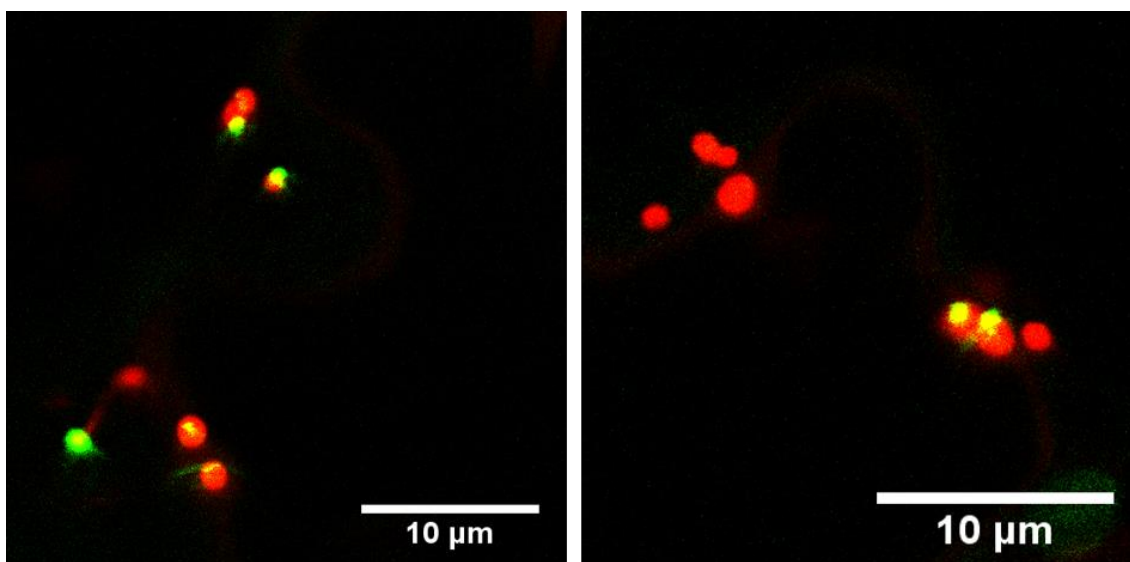
Obrázek 34: Nebyla nalezena kolokalizace signálu iGFP-*NtARPC2* a markeru pro TGN (mCherry-RAB14A). Kořen křížence rostlin *arpc2*:iGFP-*NtARPC2* a WT:mCherry-RAB14A). Optický řez středem buňky (A) a kortikální vrstvou (B).



Obrázek 35: Kolokalizace arposomů (iGFP-*NtRPC2*) s markerem pro endoplasmatické retikulum (HDEL-mCherry) v děložních lístcích mutantu *arpc2*. Není patrná žádná kolokalizace s endoplasmatickým retikulem. (rostlinky *arpc2*:iGFP-*NtARPC2* transientně transformované markerem HDEL-mCherry)

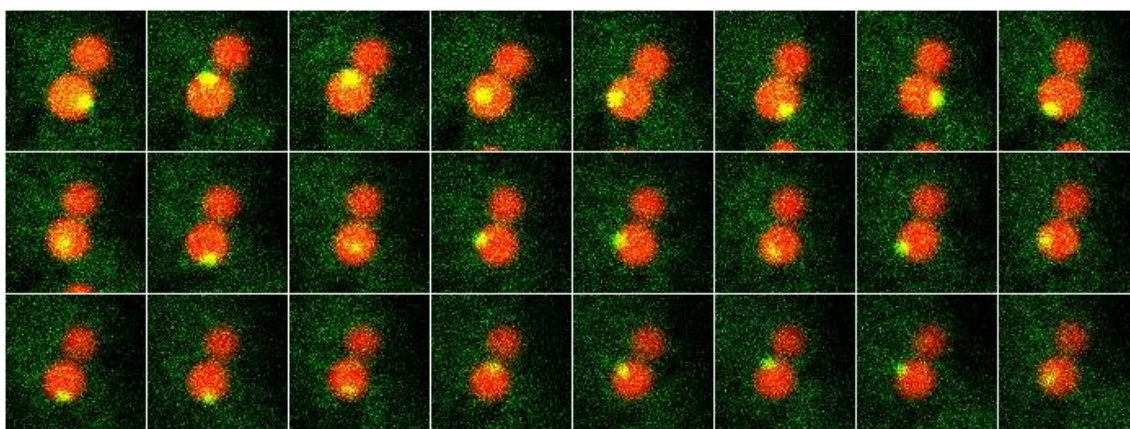


Obrázek 36: Kolokalizaci arposomů (GFP-*AtARPC5*) s markerem pro mitochondrie (MitoTracker Red) v děložních lístcích rostliny *arpc5*. signál v kortikální vrstvě (A) a na průřezu buňkou (B). Není patrná žádná kolokalizace s mitochondriemi. (rostlinky *arpc5*:GFP-*AtARPC5* barvené barvivem MitoTracker Red)



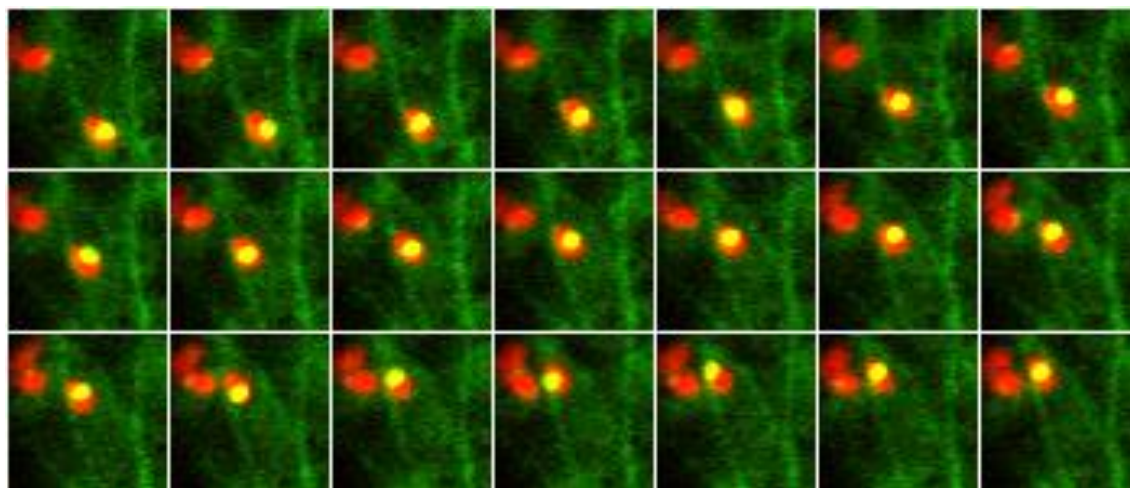
Obrázek 37: Kolokalizace arposomů s peroxisomy při transientní expresi peroxisomového markeru (mCherry-SKL) v rostlinách *arpc2::iGFP-NtARPC2*.

Další pozorování asociace arposomů a peroxisomů odhalilo některé zajímavé skutečnosti. Arposomy jsou například zcela výlučně spojené s peroxisomy - ačkoli jsou v buňce k vidění peroxisomy, které nejsou asociované s arposomy, nikdy nebyly pozorované samostatné arposomy, které by nebyly připojené k peroxisomům. Další nápadnou vlastností této asociace je, že s jedním peroxisomem je vždy spojen maximálně jeden arposom. Ať už se peroxisomy v buňce pohybují, či stojí na místě, arposomy mění polohu, jako by kolem nich obíhaly (Obrázek 38).



Obrázek 38: Vzájemná poloha peroxisomu (mCherry-SKL) a arposomu (GFP-AtARPC5) v pokožkové buňce děložního lístku mutantu *arpc5*. Zdá se, že arposom nehraje žádnou roli v ukotvení peroxisomu, naopak se zdá, že peroxisom je ukotven a arposom se kolem něj volně pohybuje. Časový krok 990 ms. (rostlinky *arpc5::GFP-AtARPC5* transientně transformované peroxisomovým markerem mCherry-SKL)

Kolokalizace systému arposom-peroxisom s markerem pro aktinový cytoskelet v živých pokožkových buňkách děložních lístků *Arabidopsis thaliana* naznačuje, že pohyb obou organel je zprostředkován interakcí peroxisomu s aktinovými vlákny. Arposom je asociovaný s peroxisomem, ale není v přímém kontaktu s aktinovým vláknem (Obrázek 39).

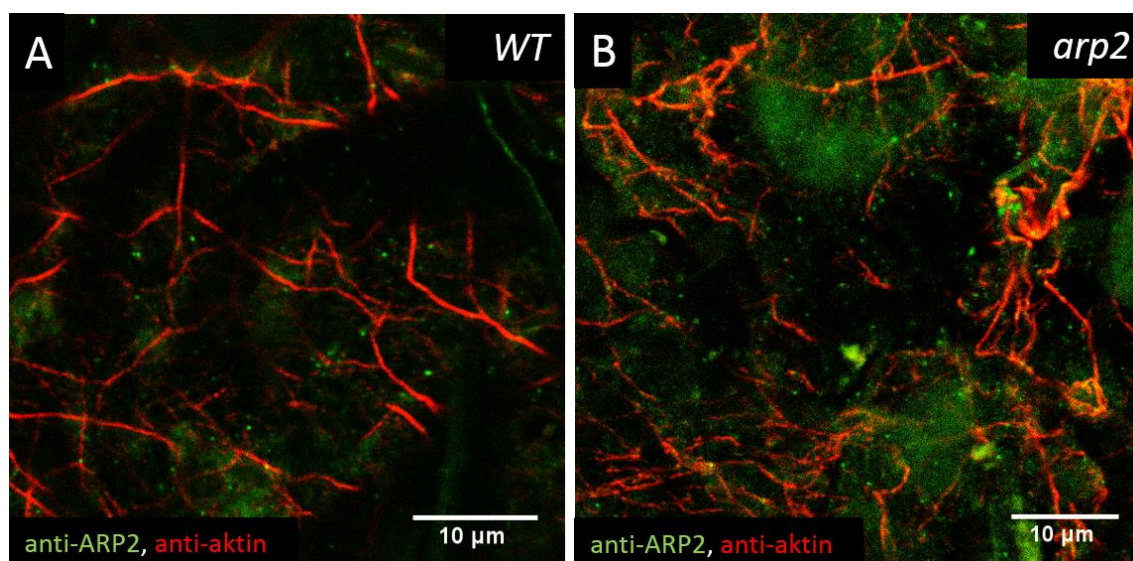


Obrázek 39: Pokožkové buňky děložních lístků rostliny *arpc2* exprimující stabilně konstrukt GFP-AtARPC2, transientně transformované markerem pro peroxisomy (mCherry-SKL) a markerem pro aktinový cytoskelet (GFP-fimbrin). Na sérii je vidět, že peroxisom se pohybuje po aktinovém vlákně a arposom se pohybuje s ním, ale sám s aktinovým vláknem přímo neinteraguje. Časový krok 1,5 s.

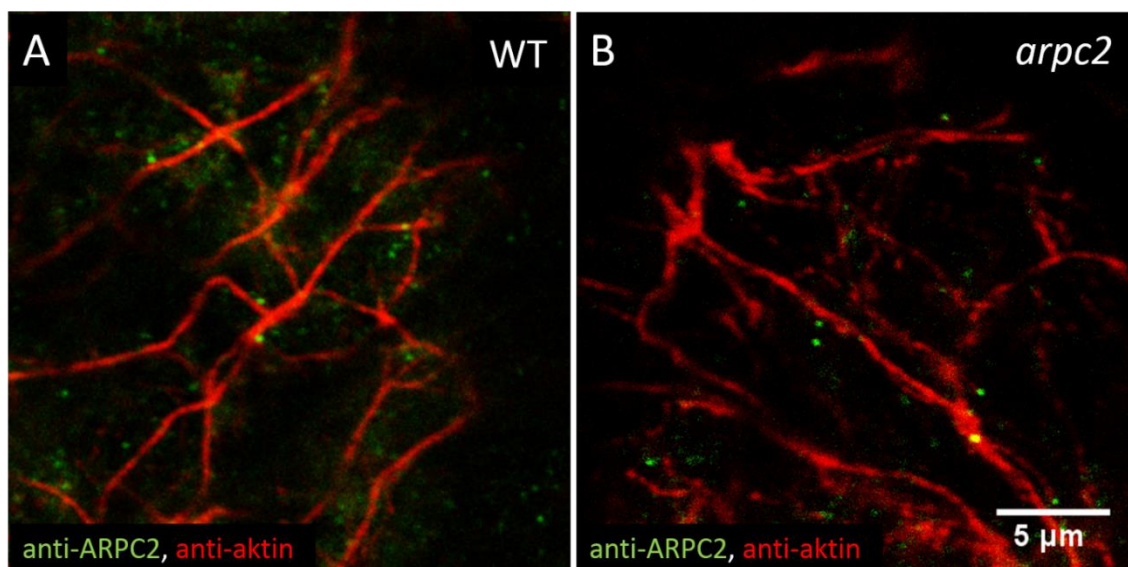
4.2 Vizualizace podjednotek ARP2/3 komplexu pomocí protilátek

Lokalizaci podjednotek fúzovaných s GFP jsme se rozhodli ověřit pomocí protilátek (Tabulka 23, 24). Vizualizovali jsme podjednotky ARP2, ARP3 a ARPC2 v pokožkových buňkách děložních lístků semenáčků *Arabidopsis thaliana*. První výsledky ukázaly u podjednotek ARP2 a ARPC2 signál uspořádaný do teček rozptýlených v cytoplasmě. V buňkách zároveň značených protilátkou proti aktinu tečky v některých případech asociovaly s aktinovými vlákny (Obrázek 40, A; Obrázek 41, A). Kontrolní imunolokalizace v pokožkových buňkách mutantních rostlin však ukázala velmi podobný vzor. Protilátka anti-ARP2 v mutantovi *arp2* (Obrázek 40, B) i protilátka anti-ARPC2 v mutantovi *arpc2* (Obrázek 41, B) vytvářely tečky, které občas asociovaly s aktinovým cytoskeletem. Z toho důvodu je pravděpodobné, že se jedná o artefakt nespecifické reakce protilátky. Vzhledem k tomu, že stejné tečky byly pozorovatelné i v buňkách barvených pouze sekundární protilátkou, bez přidání protilátky primární (Obrázek 42) jedná se s nejvyšší pravděpodobností nikoli o artefakt protilátek anti-ARP2 a anti-ARPC2, ale o nespecifickou vazbu sekundární protilátky anti-králičí-Alexa488. Protilátka proti podjednotce ARP3 v buňkách vytvářela vlákna, která takřka zcela kolokalizovala s aktinovým cytos-

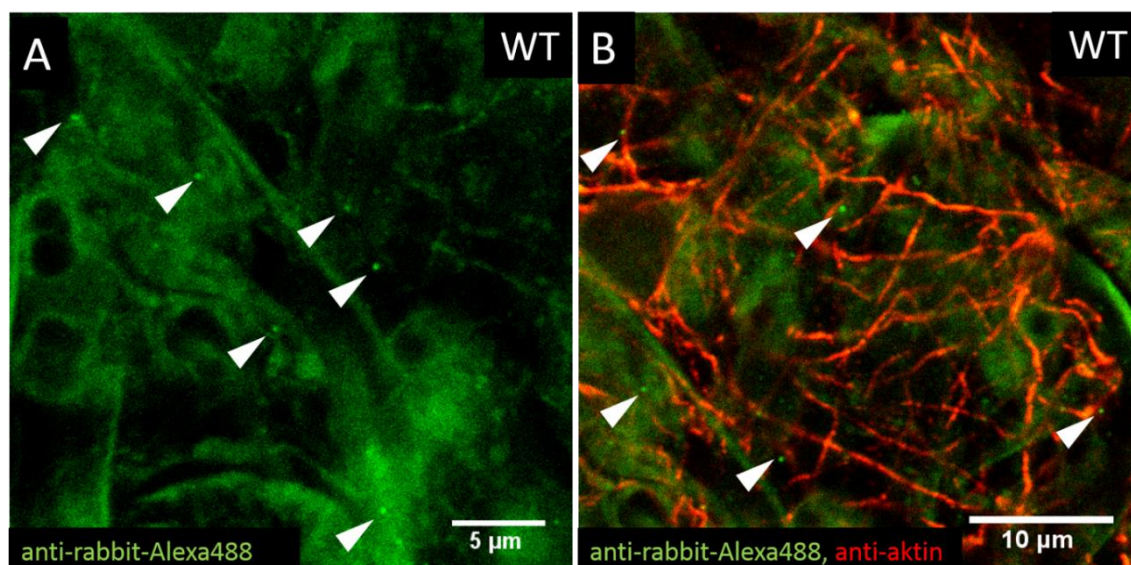
keletem. Vzhledem k faktu, že stejné značení bylo pozorováno i v buňkách mutantu *arp3* (Obrázek 43) se lze domnívat, že se jedná o nespecifické značení způsobené zřejmě velkou strukturální podobností molekul aktinu a ARP3 (Robinson et al., 2001).



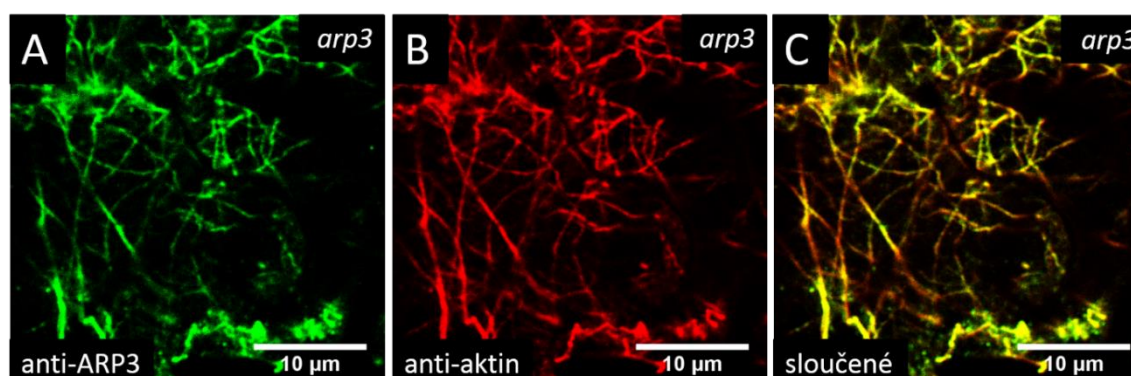
Obrázek 40: Imunolokalizace podjednotky ARP2 v pokožkových buňkách děložních lístků *Arabidopsis thaliana*. Ve WT tvoří protilátka proti ARP2 malé tečky, které částečně kolokalizují s aktinovým cytoskeletem (A). Velmi podobné tečky můžeme najít i v pokožkových buňkách mutantů *arp2*, kde by protilátka neměla s ničím reagovat (B). Jedná se tedy pravděpodobně o nespecifické značení. Primární protilátky: králičí anti-ARP2, myší anti-aktin. Sekundární protilátky: anti-králičí-Alexa488, anti-myší-Alexa555.



Obrázek 41: Také protilátka proti podjednotce ARPC2 vytváří v pokožkových buňkách děložních lístků WT *Arabidopsis thaliana* tečkovitý signál v blízkosti aktinových filament (A). I v tomto případě jsou tečky patrné i v mutantovi *arpc2*, kde by protilátka neměla reagovat (B). I tento výsledek je zřejmě artefaktem nespecifické protilátky. Primární protilátky: králičí anti-ARPC2, myší anti-aktin. Sekundární protilátky: anti-králičí-Alexa488, anti-myší-Alexa555.



Obrázek 42: Tvorba arteficiálních teček je zřejmě způsobená sekundární protilátkou anti-králičí-Alexa488, neboť tato protilátka vytvářela v pokožkových buňkách děložních lístků WT *Arabidopsis thaliana* tečky i v případě, že do reakce vůbec nebyla přidána primární králičí protilátka (A). I tyto tečky, tvořené výhradně sekundární protilátkou lokalizují do blízkosti aktinových filament (B). Primární protilátky: myší anti-aktin (B). Sekundární protilátky: anti-králičí-Alexa488, anti-myší-Alexa555 (B).



Obrázek 43: Aktinový cytoskelet v listu mutantu *arp3* (B) kolokalizuje se signálem kozí protilátky proti podjednotce ARP3 (A). Kolokalizace v mutantním pozadí ukazuje, že protilátka proti ARP3 nejspíše rozeznává aktin (C). Tento artefakt je pravděpodobně způsoben vysokou strukturní podobností obou molekul.

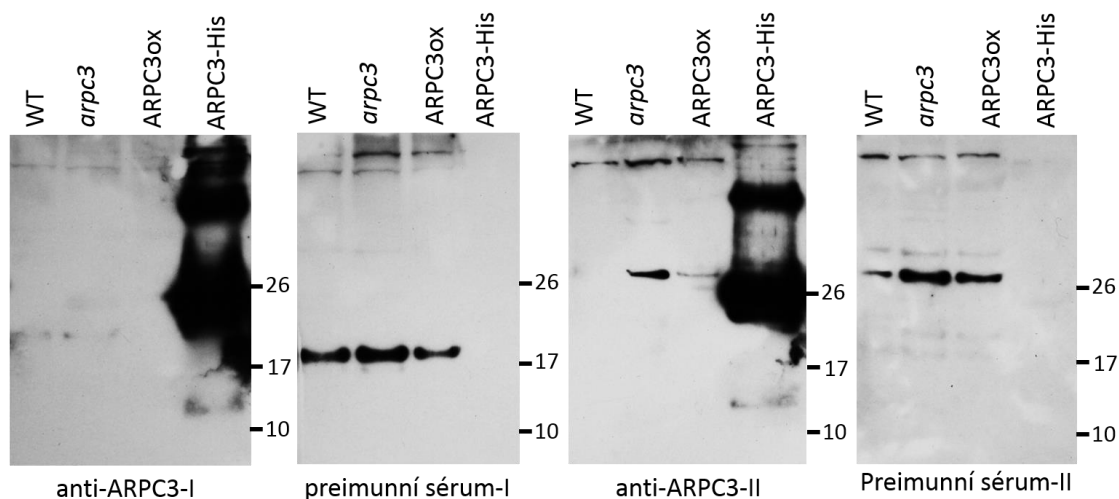
4.2.1 Příprava vlastních protilátek

Pro vizualizaci podjednotek komplexu ARP2/3 jsme se rozhodli připravit králičí protilátky proti podjednotkám ARPC3 a ARPC5. Od každé podjednotky byly vyrobeny dvě protilátky. Jejich reaktivita byla testována na izolovaných proteinech extrahovaných z rostlin *Arabidopsis thaliana* (obrázky 44-47). Jako negativní kontrola byly v případě ARPC5 použity extrakty z mutantů postrádajících danou podjednotku komplexu ARP2/3. Jako pozitivní kontrola byly v případě ARPC3, pro kterou není k dispozici mutantní linie postrádající protein,

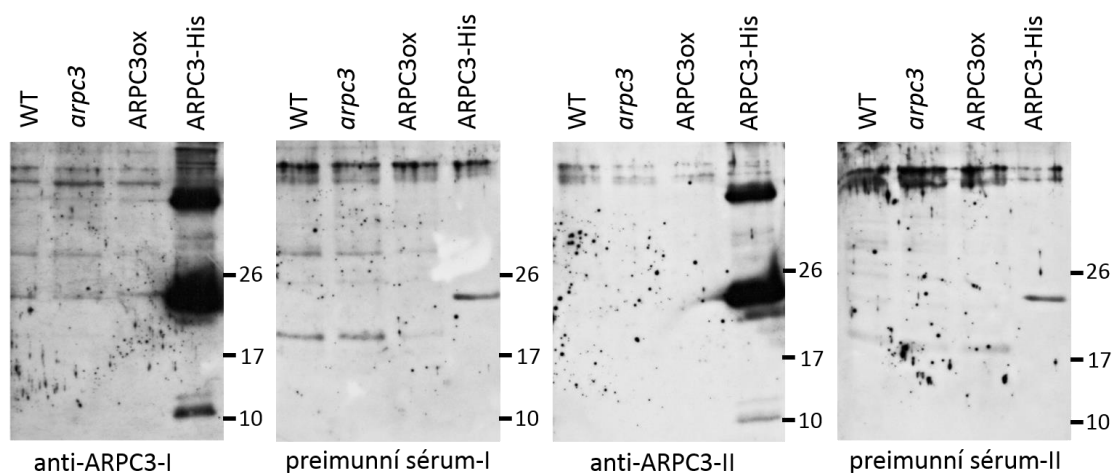
použity extrakty z mutantů, kteří danou podjednotku exprimují silněji než WT, nebo izolovaná podjednotka značená His-tagem, která byla použita k imunizaci králíků. Na stejné proteinové extrakty bylo navíc pro kontrolu vždy místo primární protilátky aplikováno také kontrolní preimunní sérum, tedy soubor protilátek, které obsahovala králíčí krev ještě před imunizací naším proteinem.

Všechny protilátky velmi silně interagovaly s kontrolními proteiny ARPC3-His a ARPC5-His, tedy s těmi, proti kterým byly skutečně vytvořeny, a z toho důvodu lze imunizaci považovat za úspěšnou. Bohužel výsledky ukázaly, že obě protilátky proti ARPC3 i ARPC5 rozeznávají nespecifické epitopy na blotech s proteinovými extrakty z rostlin *Arabidopsis thaliana*. Ani jedna neukazovala silný signál, který by odpovídal předpokládané poloze podjednotek ARPC3 nebo ARPC5 na blotu a naopak silně značily několik proužků, které vzhledem k velikosti zcela jistě podjednotkám neodpovídaly. Kromě toho, už kontrolní preimunní sérum vykazovalo silnou reaktivitu proti neodpovídajícím proteinům a preimunní séra z některých králíků dokonce rozeznávala epitopy, které velikostí odpovídají imunizačním značeným proteinům ARPC3-His a ARPC5-His. Z těchto důvodů jsme nezkoušeli vytvořené protilátky použít pro značení podjednotek komplexu ARP2/3 v buňkách. Některé western-bloty ukázaly, že preimunní sérum rozpoznává proteiny, které ve výsledném imunním séru rozpoznávané nejsou. To může být v některých případech způsobeno vyšší koncentrací preimunního séra oproti primární protilátce při detekci.

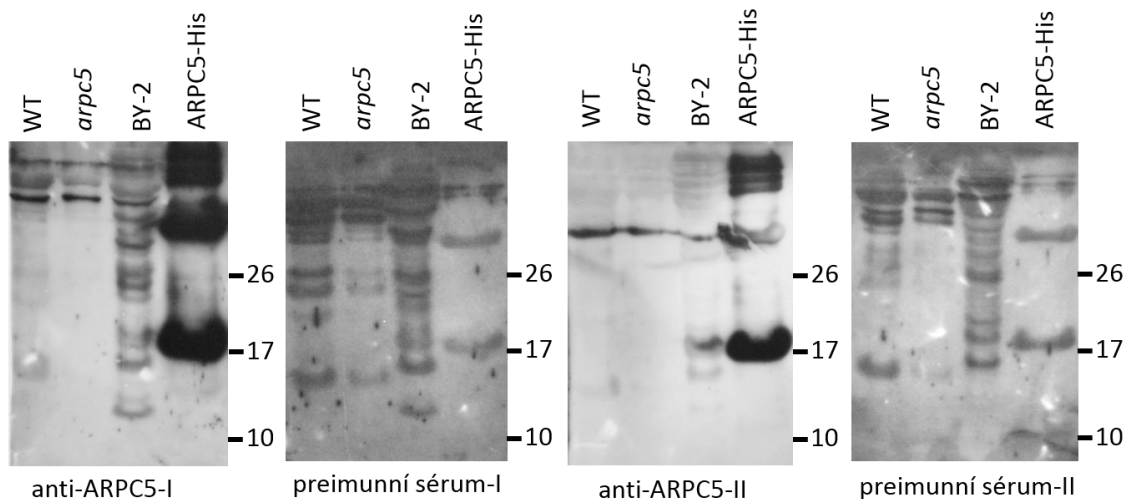
Při použití stejných protilátek proti fúzním proteinům GFP-AtARPC3 a GFP-AtARPC5 exprimovaným transientně v listech tabáku *N. benthamiana* tyto značily relativně silně pruhy odpovídající velikosti a jejich poloha odpovídala poloze značení protilátkou proti GFP. Velmi slabé pruhy jsou detekovatelné i v místě předpokládaného výskytu volných podjednotek ARPC3. (Obrázek 48).



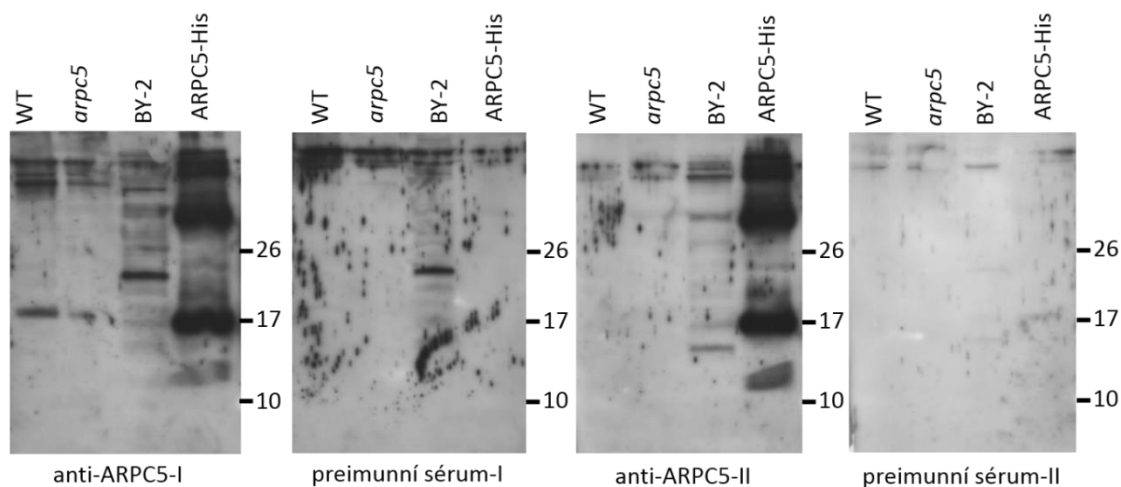
Obrázek 44: Reaktivita protilátek anti-ARPC3 proti supernatantu (rozpustná frakce) extraktů z rostlin *Arabidopsis thaliana* – WT, mutanta *arpc3* a mutanta, který podjednotku ARPC3 exprimuje více než WT (ARPC3ox). Jako kontrola je použit izolovaný ARPC3-His použitý na imunizaci. K oběma protilátkám bylo testováno kontrolní preimunní sérum, které bylo odebráno králíkům před imunizací. Podjednotka ARPC3 by měla mít molekulovou hmotnost 19,5 kDa. Proužky odpovídající velikosti však nevytváří ani jedna z protilátek, překvapivě, pruhy podobné velikosti ukazuje preimunní sérum z prvního králíka. Po imunizaci tyto protilátky záhadně mizí. Ředění primárních protilátek a preimunních sér 1:5000, ředění sekundární protilátky 1:2000.



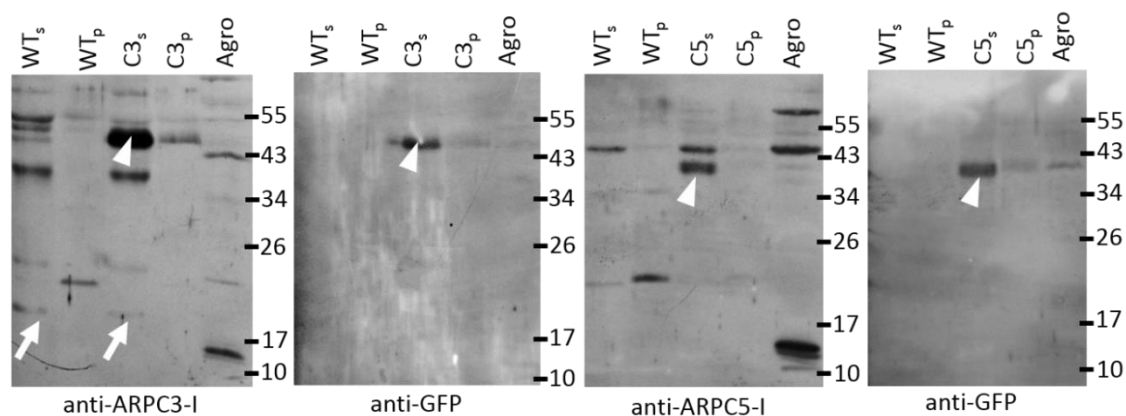
Obrázek 45: Reaktivita protilátek anti-ARPC3 proti peletu (mikrosomální frakce) extraktů z rostlin *Arabidopsis thaliana* – WT, ztrátového mutanta *arpc3* a mutanta, který podjednotku ARPC3 exprimuje více než WT (ARPC3ox). Jako kontrola je použit izolovaný ARPC3-His použitý na imunizaci. K oběma protilátkám bylo testováno preimunní sérum, které bylo odebráno králíkům před imunizací. Podjednotka ARPC3 by měla mít molekulovou hmotnost 19,5 kDa. Překvapivě, pruhy podobné velikosti ukazuje slabě preimunní sérum z prvního králíka a velmi slabě i sérum z druhého králíka. Po imunizaci tyto protilátky záhadně mizí. Kromě toho se zdá, že preimunní sérum rozeznává také epitopy o stejné velikosti jako imunizační značený protein ARPC3-His. Ředění primárních protilátek a preimunních sér 1:5000, ředění sekundární protilátky 1:2000.



Obrázek 46: Reaktivita protilátek anti-ARPC5 proti supernatantu (rozpustná frakce) extraktů z rostlin *Arabidopsis thaliana* – WT a mutanta *arpc5* a z buněk BY-2. Jako kontrola je použit izolovaný ARPC5-His použitý na imunizaci. K oběma protilátkám bylo testováno preimunní sérum, které bylo odebráno králíkům před imunizací. Podjednotka ARPC5 by měla mít molekulovou hmotnost 14,97 kDa. Proužky odpovídající velikosti však nevytváří ani jedna z protilátek, překvapivě, pruhy podobné velikosti ukazují slabě obě preimunní séra. Ředění primárních protilátek 1:2000, ředění preimunních sér 1:100, ředění sekundární protilátky 1:2000



Obrázek 47: Reaktivita protilátek anti-ARPC5 proti peletu (mikrosomální frakce) extraktů z rostlin *Arabidopsis thaliana* – WT a mutanta *arpc5* a z buněk BY-2. jako kontrola je použit izolovaný ARPC5-His použitý na imunizaci. K oběma protilátkám bylo testováno preimunní sérum, které bylo odebráno králíkům před imunizací. Podjednotka ARPC5 by měla mít molekulovou hmotnost 14,97 kDa. Proužky odpovídající velikosti však nevytváří ani jedna z protilátek. Ředění primárních protilátek a preimunních sér 1:2000, ředění sekundární protilátky 1:2000.



Obrázek 48: Reaktivita protilátek anti-ARPC3 a anti-ARPC5 proti extraktům z WT rostlin tabáku *N. benthamiana* a z listů *N. benthamiana* transientně transformovaných konstrukty GFP-AtARPC3 a GFP-AtARPC5. jako kontrola je přidán extrakt z bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, kterými byly rostliny transformovány, aby bylo vyloučeno že protilátky detekují nějaké proteiny exprimované bakteriemi. Je patrné, že protilátky rozeznávají v tabáku proteiny, které odpovídají velikostí pruhům, které detekuje protilátka anti-GFP a jedná se zřejmě o rozeznávané fúzní proteiny GFP-AtARPC3 (46,3 kDa) a GFP-AtARPC5 (41,9 kDa) – označeno klínky. Obě protilátky rozeznávají nespecificky řadu bakteriálních proteinů a zdá se, že *Agrobacterium tumefaciens* skutečně slabě exprimuje i konstrukty GFP-AtARPC3 i GFP-AtARPC5. Protilátka anti-ARPC3 rozeznává velmi slabě i epitopy, které by mohly odpovídat samotnému ARPC3 (19,5 kDa) – označeno šipkami. Ředění protilátek proti GFP-AtARPC3 a GFP-AtARPC5 1:5000, ředění protilátky proti GFP 1:1000, ředění sekundární protilátky 1:2000.

5 Diskuse

5.1 Vizualizace podjednotek komplexu ARP2/3 pomocí fúze s GFP

Oba konstrukty, GFP-AtARPC2 a GFP-AtARPC5 po transformaci do odpovídajících mutantů *arpc2* a *arpc5* komplementovaly fenotyp deformovaných trichomů (Obrázek 20) a předpokládáme, že se jedná o potvrzení jejich schopnosti tvořit s ostatními podjednotkami funkční komplex. Komplementaci fenotypu vykazovali i *arpc2* mutanti *Arabidopsis thaliana* transformované konstruktem iGFP-NtARPC2 (tabáková podjednotka ARPC2 fúzovaná s GFP pod promotorem indukovatelným β -estradiolem). Komplementace mutantního fenotypu podjednotkou z jiné rostliny není překvapivá vzhledem k silně konzervované funkci komplexu ARP2/3 v rámci eukaryot. Publikované práce ukazují, že podjednotky mohou fungovat při výměně mezi mnohem vzdálenějšími organismy, například podjednotka ARP3 z *Arabidopsis thaliana* funguje v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* (Le et al., 2003), nebo naopak lidská podjednotka ARPC5 komplementuje mutaci v *arpc5* mutantovi *Arabidopsis thaliana* (Mathur et al., 2003b). Kromě toho všechny tři fúzní proteiny vykazovaly po stabilní transformaci stejnou distribuci fluorescenčního signálu. To napovídá, že by se mohlo jednat o skutečnou fyziologickou lokalizaci celého komplexu spíše než o arteficiální umístění jednotlivých podjednotek. Kromě difusního cytoplasmatického signálu byla pozorována lokalizace všech podjednotek v jádře a překvapivě také do velmi motilních teček. V cytoplasmatickém signálu nebyla patrná žádná struktura a jedná se zřejmě o volně rozpuštěný komplex ARP2/3, případně samostatné podjednotky, které jsou v nadprodukci exprimovány pod promotorem 35S, stechiometricky přecházejí ostatní podjednotky a nemohou se proto vázat do komplexu.

5.1.1 Jaderná lokalizace podjednotek komplexu ARP2/3

Proteiny GFP-AtARPC2 a GFP-AtARPC5 v mutantech *Arabidopsis thaliana arpc2* a *arpc5* vykazovaly lokalizaci do cytoplasmy, motilních teček a do jádra. Kromě toho byly všechny konstrukty podjednotek ARP2/3 fúzované s GFP pro ověření funkčnosti nejprve transientně transformovány do listů tabáku *Nicotiana benthamiana*. Z tohoto pokusu víme, že i podjednotky ARP2, ARP3, ARPC3 a ARPC4, které se nepodařilo transformovat do *Arabidopsis thaliana*, lokalizují do jádra. Jadernou lokalizaci komplexu ARP2/3, respektive protilátky ARPC4 značené HA-tagem pozorovali v pokožkových buňkách *Arabidopsis thaliana* také Zhang et al. (2013). Může se jednat o prostou difuzi signálu do jádra, neboť maximální velikost proteinů, které jsou schopné projít jaderným pórem je cca 110 kDa (Wang and Brattain, 2007), zatímco velikost proteinu ARP3, největší podjednotky komplexu ARP2/3, je i s připojeným GFP pouhých cca 75 kDa. Zdá se však, že síla signálu v jádře může být jiná než v cytoplasmě. V elongovaných buňkách kořene byl signál v jádře až dvakrát silnější než v cytoplasmě, v případě

transientní transformace GFP-AtARPC3 do tabákových listů byla fluorescence v jádře dokonce až cca čtyřikrát silnější než v cytoplasmě (Obrázek 24). Naopak v buňkách kořenové špičky byla v jádře pozorována slabší fluorescence než v okolní cytoplasmě (Obrázek 21, A). Tyto rozdíly byly pozorovány na optických řezech v konfokálním mikroskopu a nemělo by se tudíž jednat o artefakt způsobený vyšším objemem jádra vůči kortikální cytoplasmě. Zdá se tedy, že se podjednotky značené GFP mohou v jádře kumulovat i z něj být vyloučeny. Kromě ARP2 a ARP3, které tvoří funkční centrum komplexu ARP2/3 existuje ještě několik dalších proteinů ze skupiny ARP (actin related protein), které nejsou součástí komplexu ARP2/3. Proteiny ARP4 – ARP9 mají všechny jadernou lokalizaci a zdá se, že mohou hrát roli v remodelaci chromatinu (Oma and Harata, 2011). Pro možnou fyziologickou funkci komplexu ARP2/3 v jádře by mohl svědčit fakt, že jadernou lokalizaci mají v živočišných buňkách i některé další nukleátory aktinu jako forminy, JMY, APC a nachází se tam i NPF rodiny WASP (Weston et al., 2012). Například N-WASP dokonce obsahuje jadernou lokalizační sekvenci (NLS) i jadernou exportní sekvenci (NES) a jeho aktivní forma je do jádra alokována častěji než neaktivní (Suetsugu and Takenawa, 2003). Je však třeba vzít v úvahu, že u rostlin řídí aktivaci komplexu ARP2/3 pouze NPF z rodiny SCAR/WAVE a jak on, tak proteiny se kterými tvoří regulační komplex SCAR/WAVE mají jinou buněčnou lokalizaci než N-WASP. Ani BRICK1 ani SCAR1 značené pomocí fluorescenčních proteinů nebyly v jádře pozorovány (Dyachok et al., 2008). Význam aktinu a jeho nukleátorů v buněčném jádře je v poslední době intenzivně studované téma (Weston et al., 2012) a proto by bylo záhodno jadernou lokalizaci podjednotek komplexu ARP2/3 hlouběji prověřit.

Výjimečně, leč opakovaně bylo možné pozorovat tečky odpovídající jinak cytoplasmatickým arposomům v jádře (Obrázek 22, B). Tato pozorování byla vždy získána na spinning disc mikroskopu a nikdy se je nepodařilo zopakovat na klasickém konfokálním mikroskopu. Z tohoto důvodu se domnívám, že se jedná o artefakt zobrazení spinning disc mikroskopu, který do optického řezu dovoluje vstup signálu i z jiných rovin ostrosti.

5.1.2 Lokalizace podjednotek komplexu ARP2/3 do arposomů

Kromě lokalizace v jádře vykazovaly shodně všechny značené podjednotky lokalizaci do motilních teček, které jsme pracovníě pojmenovali jako arposomy. Ty se pohybovaly typickým stop-and-go pohybem, tedy střídaly rychlý směrovaný pohyb s oscilací na jednom místě. Lokalizace signálu podjednotek komplexu ARP2/3 do teček v cytoplasmě je publikována v mnoha pracích provedených na rostlinných i živočišných modelech za použití protilátek i vizualizace pomocí fúze s fluorescenčním proteinem. Ve fibroblastech T3T odhalily protilátky proti podjednotkám ARP3, ARPC2 a ARPC3 všechny podobnou lokalizaci do lamellipodií na

okrajích buněk a do teček v cytoplasmě (Welch, 1997), stejný tečkovaný a lamellipodiální signál odhalila protilátka proti ARPC2 v buňkách HeLa (Hölttä-Vuori et al., 2005). Bohužel, tyto práce vycházely z fixovaného materiálu a není tedy možné zjistit, zda jsou tečky v živočišných buňkách také pohyblivé. Imunolokalizace v rostlinném materiálu také odhalila tečkovaný signál. Například protilátky proti podjednotce ARP3 z *Dictyostelium discoideum*, značené zlatými kuličkami lokalizovaly v kořenech kukuřice do membrán endoplasmatického retikula a do kulovitých organel, pravděpodobně MVB (multi-vesicular bodies) a endosomů (Van Gestel et al., 2003). V buňkách tabákové suspence BY-2 detekovaly protilátky proti ARP2 tečky, které částečně kolokalizovaly s aktinovým cytoskeletem a po jeho rozrušení působením chladu fungovaly tyto tečky jako počátky nukleace nových vláken (Fišerová et al., 2006). Tečkovitou lokalizaci podjednotky ARPC4 značené HA-tagem odhalily v pokožkových buňkách také Zhang et al. (2013). Vizualizace pomocí fúze s fluorescenčními proteiny přinesla podobné výsledky – podjednotka ARP3 fúzovaná s RFP vytváří v buňkách BY-2 prakticky totožné tečky asociované s aktinovým cytoskeletem, jako protilátka proti ARP2 (Maisch et al., 2009). Kromě toho byla podjednotka komplexu SCAR/WAVE, SCAR1, značená fúzí s GFP, lokalizována v mladých trichomech do blíže neurčených organel (Dyachok et al., 2008). Tečkovitý signál naznačuje, že by komplex ARP2/3 mohl tvořit v buňkách shluky nebo, že je navázán na nějakých membránových organelách. To podporují pokusy, které opakovaně nachází podjednotky komplexu ARP2/3 pomocí protilátek v mezi proteiny z mikrosomální frakce (Kotchoni et al., 2009; Zhang et al., 2013). Je zajímavé, že ačkoli v pracích provedených na BY-2 (Maisch et al., 2009) pozorují autoři tečky velmi podobné našim arposomům, nikdy se nezmiňují o jejich pohyblivosti, což je pro arposomy zásadní znak. Jediná práce srovnatelná metodicky s naší – pozorování podjednotky ARPC5 fúzované s GFP v buňkách živých rostlin *Arabidopsis thaliana* (Yanagisawa et al., 2015) bohužel tečkovaný signál nezmiňuje vůbec.

5.1.3 Jsou arposomy pouze arteficiální shluky overexprimovaného proteinu?

Expres podjednotek pod silným promotorem 35S s sebou nese riziko nefysiologického chování exprimovaných proteinů v nadbytku a není proto vyloučeno, že arposomy jsou arteficiální shluky nadprodukováných proteinů. Vzhledem k tomu, že všechny testované podjednotky vytváří v buňkách stejné arposomy, domnívám se, že se jedná skutečně o jejich fyziologickou lokalizaci. K ověření fyziologické funkce arposomů by napomohlo zjistit, zda jsou tvořeny celým komplexem, nebo pouze jednou nadprodukovanou podjednotkou. Za tímto účelem by bylo vhodné izolovat arposomy z transformovaných rostlin například pomocí metody OFACS (organelle flow after cell sonication) (Degtyarev et al., 2014), a detekovat přítomnost ostatních podjednotek pomocí western-blotu nebo hmotnostní spektrometrie. Další

možností by bylo transformovat podjednotky fúzované s GFP do rostlin s mutací v jiných podjednotkách komplexu ARP2/3. Tím by se ukázalo, zda je pro tvorbu arposomů nutná celistvost komplexu. Tomu by nasvědčovala např. práce, kterou publikovali Kotchoni et al. (2009), ukazující, že komplex ARP2/3 je asociovaný s mikrosomálními membránami pouze pokud je intaktní. Expres podjednotek komplexu ARP2/3 fúzovaných s GFP exprimovaná pod přirozeným promotorem by také mohla ukázat, zda jsou arposomy artefakt nadměrné exprese způsobené silným promotorem, nebo zda se jedná o fyziologickou strukturu.

5.1.4 Vztah arposomů a aktinového cytoskeletu

Arposomy se v buňkách typicky pohybují podél aktinových vláken. To bylo pozorováno při společné expresi s markery pro aktinový cytoskelet mCherry-FABD a lifeact-mRFP. Na fixovaných vzorcích značených protilátkami i v živých buňkách bylo patrné, že arposomy a aktinové kabely k sobě často nepřiléhají dokonale a je mezi nimi zjevná mezera. Později bylo toto vysvětleno zjištěním, že všechny arposomy jsou asociované s peroxisomy. Na rozdíl od živočichů, v jejichž buňkách se peroxisomy pohybují podél mikrotubulů, se u rostlin pohybují peroxisomy podél aktinových vláken (Mathur et al., 2002), nejspíše pomocí myosinových motorů (Avisar et al., 2008). To vedlo k vysvětlení, že mezera mezi arposomem a aktinovými kabely je ve skutečnosti vyplněna peroxisomem. Tato myšlenka byla nakonec potvrzena v rostlinách exprimujících markery pro aktin, peroxisomy a podjednotky komplexu ARP2/3 zároveň (Obrázek 39). Z literatury víme, že tečky ARP3-RFP v buňkách BY-2 fungovaly po depolymeraci aktinového cytoskeletu jako místa nukleace nových vláken, což je ve shodě s představou o funkci komplexu ARP2/3 jako nukleátoru aktinu. S našimi buňkami jsme nezkoušeli cytoskelet depolymerovat, ale zdá se, že arposomy jako nukleační centra nefungují. Při kolokalizaci s aktinem, ať už pomocí protilátek či markerů fúzovaných s fluorescenčními proteiny nebylo nikdy pozorováno, že by se v blízkosti arposomů vytvářela nová vlákna, či oblaky jemně větveného aktinu. To naznačuje, že pokud jsou podjednotky komplexu ARP2/3 v arposomu složeny do komplexu, tak není aktivní. Uložení neaktivního komplexu do membránových organel predikoval na základě svých pokusů již Zhang et al. (2013). Pro ověření bylo zajímavé otestovat lokalizaci našich proteinů v buňkách s mutací v regulačním komplexu SCAR/WAVE.

Nikdy nebyla pozorována žádná jiná interakce našich fúzních proteinů s aktinem, než ve formě arposomů pohybujících se podél aktinových kabelů. Nikdy nebyl pozorován signál žádné podjednotky v místě větvení aktinových vláken, jak to popisují např. Fišerová et al. (2006) To je překvapivé vzhledem k tomu, že u transformovaných mutantů dochází k záchranné fenotypu a komplex by tedy měl být funkční.

5.1.5 Vztah arposomů a mikrotubulárního cytoskeletu

Ačkoli se arposomy v naprosté většině případů pohybují podél aktinových filament, zdá se, že mohou interagovat i s mikrotubuly. V buňkách s označeným tubulinem (RFP-TUA5) bylo pozorováno, že arposomy, pohybující se cytoplasmatickým prouděním, se mohou zastavit na mikrotubulu, nějaký čas na něm setrvat a následně pokračovat dále (Obrázek 32). V některých případech se dokonce zdálo, že se arposom pohybuje podél mikrotubulu. Protože však byl vizualizovaný pouze mikrotubulární cytoskelet, nelze vyloučit, že ve skutečnosti se pohyboval po aktinovém vláknu uloženém těsně podél mikrotubulu. Rostliny s barevně odlišenými markery pro aktinový a mikrotubulární cytoskelet by byly užitečné pro ověření této spojitosti. Interakci teček podjednotky ARPC4 značené HA-tagem s mikrotubuly pozorovali ve fixovaných pokožkových buňkách *Arabidopsis thaliana* už Zhang et al. (2013) a nasvědčuje jí i naše pozorování, že tabáková podjednotka ARPC2 vytváří někdy vláknité struktury které kolokolizují s mikrotubuly (Obrázek 28, Obrázek 31). Ze všech testovaných podjednotek vytváří vláknité struktury v buňkách pouze iGFP-NtARPC2, tedy tabáková podjednotka fúzovaná s GFP a exprimovaná pod promotorem indukovaným β -estradiolem. Vzhledem k tomu, že vláknité struktury vznikaly hlavně v silně exprimujících buňkách, domnívám se, že je to právě silná exprese, co vede ke značení mikrotubulů. Vždy, když byla vlákna pozorována, bylo to v rostlinkách, které byly indukovány desetkrát vyšší koncentrací β -estradiolu, než jaká je považována za dostatečnou. Tyto výsledky naznačují, že komplex ARP2/3 by mohl interagovat jak s aktinovým tak mikrotubulárním cytoskeletem a případně zprostředkovávat i jejich interakci. Změny v uspořádání mikrotubulárního cytoskeletu u mutantů v komplexu ARP2/3 popisují např. Schwab et al. (2003). Předběžné pokusy ukazují, že značení mikrotubulů je narušeno v mutantech v různých podjednotkách komplexu ARP2/3. To by naznačovalo, že se nejedná pouze o podjednotku ARPC2, která interaguje s mikrotubuly, ale je potřeba celý komplex (Obrázek 30). Tyto výsledky vychází zatím z jediného biologického opakování a bude nutné pokus zopakovat. Bylo by zajímavé otestovat tvorbu vláken v mutantech regulačního komplexu SCAR/WAVE, aby se ověřilo, zda je tato schopnost vázaná na nukleární aktivitu komplexu ARP2/3.

5.1.6 Interakce arposomů a peroxisomů

Kolokalizační studie ukázaly, že arposomy jsou v buňkách výlučně asociované se subpopulací peroxisomů. Z fotografií a videí z konfokálního mikroskopu se zdá, že peroxisomy a arposomy jsou dvě různé organely, které jsou těsně spojené. Není ale vyloučeno, že se jedná o artefakt způsobený silným fluorescenčním signálem tvořeným velmi nahloučeným GFP a ve skutečnosti se jedná pouze o subdoménu peroxisomu. Tomu by nasvědčoval fakt, že zatímco pero-

xisomy bez asociovaného arposomu jsou v buňkách běžné, samostatné arposomy dosud nikdy pozorovány nebyly. Pokud by byl arposom samostatná organela se samostatnou biogenezí nezávislou na peroxisomu, alespoň občas by mohl být pozorovatelný i mimo asociaci s peroxisomem. Pokud by byl arposom spíše shlukem podjednotek, či celého komplexu ARP2/3 asociovaným s peroxisomem, jednalo by se nejspíše o vnější lokalizaci na peroxisomální membráně. Pro import do peroxisomů je třeba, aby byl protein vybaven lokalizační sekvencí PTS1 nebo PTS2 (peroxisome targeting signal) PTS1 je sekvence tří aminokyselin na C-konci, nejčastější značka je SKL, ale mohou to být i další sekvence, např. SRL, SRM, SKM, ARL, ARM, AKL, SRI, PRL, SKI, PM, PKL, CRK, CKL, SRV, SNL, ANL, SML, SNM, SSM, SHL, nebo AHL. PTS2 je komplikovanější sekvence na N-konci, nejčastější verze je možno vyjádřit zápisem R-L/I-X₅-H/Q-L (Reumann et al., 2004). Pro detekci PTS1 byla použita databáze PredPlant-PTS1 (Reumann et al., 2012), sekvence PTS2 byly hledány manuálně. Ani jednu značku pro import do peroxisomu jsem nenalezl u žádné z podjednotek komplexu ARP2/3 ani regulačního komplexu SCAR/WAVE. Recentní práce díky pokročilým bioinformatickým metodám ukazují, že diversita lokalizačních sekvencí může být vyšší, než se dříve soudilo (Chowdhary et al., 2012), a proto není zcela vyloučeno, že budou objeveny další lokalizační sekvence, díky kterým by mohly být podjednotky komplexu ARP2/3 přeci jen do peroxisomu transportovány. Podařilo se objevit PTS1 v sekvenci SPIKE1, což je to GEF, který aktivuje GTPázy rodiny ROP, které aktivují regulační komplex SCAR/WAVE, který aktivuje komplex ARP2/3. Jak ale ukazuje koexprese markerů pro podjednotky komplexu ARP2/3 a aktinový cytoskelet, arposomy nejspíše nefungují jako nukleační centra a SPIKE1 zde tudíž zřejmě svou aktivační roli neplní. Vzhledem k tomu, že SPIKE1 lokalizuje do ERES domén na ER (Zhang et al., 2010), je možné že hraje roli v biogenezi peroxisomů z ER. Model arposomu jakožto shluku komplexu ARP2/3 na membráně peroxisomu by odpovídala závěrům, ke kterým došli Kotchoni et al. (2009), kteří předpokládají, že komplex ARP2/3 je ve složeném stavu periferně ukotven k membráně. Pokud se jedná o periferní membránový protein, je zajímavá jeho lokalizace do jednoho místa na peroxisomální membráně. Takovou lokalizaci vykazují v některých případech například peroxisomální membránové proteiny PEX8, PEX10, PEX14 a PEX25 v buňkách kvasinky *Hansenula polymorpha* (Cepińska et al., 2011). Při ověření vztahu peroxisomů a arposomů a pro získání lepší představy o podstatě arposomu jako takového by mohla velmi napovědět transmisní elektronová mikroskopie nebo ještě lépe CLEM (Correlative Light and Electron Microscopy) mikroskopie (Johnson et al., 2015).

5.2 Funkce arposomu

Pokud předpokládáme, že arposom je fyziologická struktura a nejedná se o pouhé arteficiální shluky overexprimované podjednotky, jaká je jeho funkce v asociaci s peroxisomem?

5.2.1 Ovlivňuje arposom pohyblivost peroxisomu?

Vzhledem k faktu, že v rostlinných buňkách se peroxisomy pohybují podél aktinových vláken (Mathur et al., 2002; Jedd and Chua, 2002), naskytá se otázka, zda arposom nemůže hrát roli v asociaci peroxisomu s vlákny aktinového cytoskeletu. V buňkách kvasinek je komplex ARP2/3 částečně zodpovědný za pohyb mitochondrií po aktinových kabelech. Pravděpodobně polymerací nových vláken postrkuje mitochondrii podobně, jako se v hostitelských buňkách pohybuje *Listeria monocytogenes*. Přestože se na pohyblivosti mitochondrií podílí i myosinový motor Myo2, kvasinky s mutací v komplexu ARP2/3 mají problém se správným rozchodem mitochondrií do pučících dceřiných buněk (Valiathan and Weisman, 2008; Boldogh et al., 2001). Ačkoli některé rostlinné studie dávají takové funkci prostor pozorováním, že inhibitory myosinu (BDM) pohyb peroxisomů v rostlinných buňkách pouze zpomalují, ale ne zcela zastavují (Mathur et al., 2002), recentnější práce pomocí RNA interference ukazují, že za pohyb peroxisomů je skutečně zodpovědný především myosin XI-K a v menší míře myosiny XI-2 a XI-F (Avisar et al., 2008). Pohyb peroxisomů v neexpandovaných částech trichomů mutanta *arpc5* byl až 15x pomalejší než u WT, to však bylo způsobeno změnou struktury aktinového cytoskeletu v mutantovi – peroxisomy se zasekávaly v místech husté spleti aktinových kabelů které v *arpc5* nahrazují jemnou aktinovou síť (Mathur et al., 2003b). Role arposomů při interakci peroxisomů s aktinem by mohla být podobná jako role komplexu ARP2/3 v interakci aktinových vláken a endosomů. Pokud dojde v buňkách HeLa k mutaci proteinu MLN64, který kotví komplex ARP2/3 v membráně endosomů, vede to k odpojení endosomů od aktinových kabelů a k nižší kosedimentaci endosomálního markeru s aktinem (Hölttä-Vuori et al., 2005)

Naše pozorování z buněk exprimujících zároveň GFP-AtARPC5, a markery pro peroxisomy (mCherry-SKL) a aktinový cytoskelet (GFP-fimbrin) však naznačuje, že arposom s aktinovým cytoskeletem pravděpodobně přímo neinteraguje (Obrázek 39) a proti roli arposomu v motilitě svědčí i fakt, že pohyblivé jsou i peroxisomy které s arposomem neasociují. Pro lepší prozkoumání interakce peroxisomu, arposomu a cytoskeletu je třeba tříbarevné značení těchto organel a také mikroskopie s vyšším časoprostorovým rozlišením – například lattice light sheet microscopy (Chen et al., 2014), či SIM mikroskopie (Komis et al., 2015) pro pozorování *in vivo*, nebo některá z metod elektronové mikroskopie. Porovnání motility peroxisomů v buňkách WT a mutantů v komplexu ARP2/3 případně SCAR/WAVE je další možností, jak ověřit vztah komplexu ARP2/3 a pohyblivosti peroxisomů.

5.2.2 Hraje arposom roli v dělení peroxisomu?

Vzhledem k tomu, že ne všechny peroxisomy jsou asociované s arposomem, je pravděpodobné, že tato asociace je omezena pouze do určité fáze života peroxisomu, například jeho

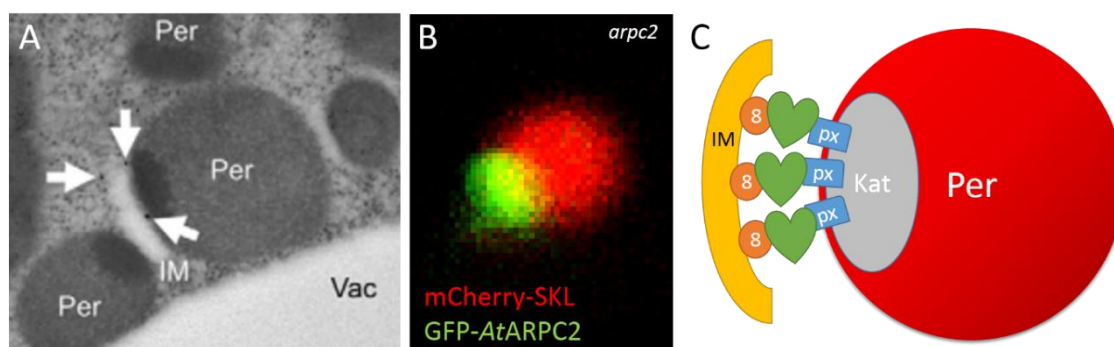
dělení. Peroxisomy jsou schopné se v živočišných buňkách množit dvěma způsoby - dělením již existujících peroxisomů na peroxisomy dceřiné nebo *de novo* biogenezí z ER. U rostlin bylo pozorováno dělení peroxisomů, ale neexistuje žádný přímý důkaz pro tvorbu peroxisomů z ER (Hu et al., 2012). Při dělení peroxisomů dochází nejprve k tvorbě výběžku, jeho prodloužení, konstrikci a následnému odstřižení nového peroxisomu pomocí proteinů příbuzným dynaminu (Smith and Aitchison, 2013). Například v kvasinkách je dělení peroxisomů spojeno se změnou lokalizace peroxinů PEX8, PEX10, PEX14 a PEX25 v peroxisomální membráně. Zatímco normálně jsou tyto proteiny rovnoměrně rozloženy po celé peroxisomální membráně, při dělení peroxisomu lokalizují do místa, kde dochází k tvorbě výběžku, ze kterého vznikne dceřiný peroxisom (Cepińska et al., 2011). Vzhledem k tomu, že tato lokalizace vypadá velmi podobně jako lokalizace arposomu, naskytá se možnost, že by komplex ARP2/3 mohl hrát roli v této změně lokalizace peroxinů, případně i v samotném procesu vzniku extenze, ze které se pak odštěpuje dceřiný peroxisom. Tomu by mohla stranit i studie ukazující, že tvorba váčků odvozených od GA je u živočichů spojena s aktivitou aktinu, pravděpodobně řízenou i komplexem ARP2/3 (Fucini et al., 2002) a o vlivu aktino-myosinového komplexu v dělení peroxisomů uvažují i Jedd and Chua (2002). Pro ověření této možnosti by bylo vhodné otestovat, zda mají peroxisomy v mutantech komplexu ARP2/3 problémy s dělením, což by se projevilo nejspíše méně početnými a většími peroxisomy jako například u mutantů *drp5* (Zhang and Hu, 2010)

5.2.3 Hraje arposom roli v degradaci peroxisomu?

Další možnou funkcí arposomu je jeho role v degradaci peroxisomů. V peroxisomech probíhá intenzivní metabolismus, jehož vedlejším produktem je peroxid vodíku, který je velmi reaktivní a musí být proto enzymem katalázou rozkládán na vodu a kyslík. Ta je svým substrátem zároveň degradována a ve starších peroxisomech se tak kumuluje neaktivní kataláza a vzrůstá koncentrace peroxidu vodíku. Neaktivní peroxisomy jsou selektivně degradovány pomocí specifické autofagie, nazývané pexofagie. Je možné, že arposomy mohou značit peroxisomy k degradaci, či hrají nějakou roli přímo v pexofagii samotné.

V poškozených peroxisomech *Arabidopsis thaliana* se kumuluje neaktivní katalasa v podobě elektrondensních shluků umístěných poblíž peroxisomální membrány. Isolační membrána (IM), útvar, ze kterého následně vzniká autofagosom překvapivě vždy asociuje s peroxisomem právě v místě, kde je kondensovaná katalasa (Yoshimoto et al., 2014). Shluky nefunkční katalasy tak jsou zřejmě to, co definuje nefunkční peroxisomy a rekrutuje k nim autofagosom. Vzhledem k podobnosti lokalizace shluků katalasy a isolační membrány s lokalizací arposomu se nabízí možnost, že komplex ARP2/3 hraje nějakou roli v asociaci těchto dvou struktur (Ob-

rázek 49). Spojitost mezi komplexem ARP2/3 a pexofagií by nasvědčovala i studie která ukazuje, že u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* je pro pexofagii přebytečných peroxisomů nezbytný aktinový cytoskelet. Při kultivaci s médiem obsahujícím latrunkulin A, aktin depolymerující drogu, nebyly kvasinky schopné autofagické degradace přebytečných peroxisomů (Reggiori, 2005). Na druhou stranu není komplex ARP2/3 v arposomech zřejmě aktivní jako nukleátor aktinového cytoskeletu a jeho význam v tomto kontextu je tedy sporný.



Obrázek 49: Model možné funkce komplexu ARP2/3 v pexofagii. Nefunkční peroxisomy jsou typické kondenzovanou nefunkční katalasou kumulovanou v blízkosti membrány (elektrondensní shluky uvnitř peroxisomů). Izolační membrána (IM), membránový útvar, ze kterého vzniká autofagosom (elektronlucetní oblast v blízkosti peroxisomu) vždy u peroxisomu lokalizuje do oblasti kondenzované katalasy. Šipky označují protein AGP8 na membráně IM (A, upraveno dle Yoshimoto et al., 2014). Vzhledem k podobnosti lokalizace arposomu (B) s lokalizací kondenzované katalázy či isolační membrány se nabízí možnost, že komplex ARP2/3 hraje roli v asociaci těchto struktur (C, IM = isolační membrána, 8 = ATG8, srdíčka = komplex ARP2/3, px = peroxiny, Kat = katalasa, Per = peroxisom).

Mutace v komplexu ARP2/3 způsobují problémy se splýváním vakuol ať už u kvasinek (Eitzen et al., 2002) nebo u rostlin *Arabidopsis thaliana* (Mathur et al., 2003a), komplex ARP2/3 by tedy mohl hrát roli i ve splývání autofagosomů s vakuolární membránou. Spojitost arposomů s pexofagií by podpořil pokus, který by ukázal, že arposomy asociují pouze s poškozenými peroxisomy. To by bylo možné ukázat například pomocí markeru jako je roGFP, který mění fluorescenci v závislosti na redoxním potenciálu – v poškozených peroxisomech určených k degradaci je neaktivní kataláza a kumuluje se v nich peroxid vodíku, který tento marker oxiduje a tím mění jeho fluorescenci (Shibata et al., 2013).

O podstatě a funkci arposomu by mohla velmi napovědět izolace interakčních partnerů, se kterými jsou podjednotky komplexu ARP2/3 v arposomu asociované. K tomu by bylo vhodné arposomy izolovat například pomocí OFACS metody nebo GFP-pulldown.

5.3 Vizualizace podjednotek komplexu ARP2/3 pomocí protilátek

Pokusy s vizualizací podjednotek komplexu ARP2/3 pomocí protilátek ukázaly v buňkách tečky, které mnohdy asociovaly s aktinovými filamenty, vzhledem k přítomnosti stejných teček v mutantních rostlinách postrádajících cílové proteiny se však zjevně jedná o artefakt. Pokusy s barvením preparátů bez primární protilátky ukazují, že se s nejvyšší pravděpodobností jedná o chybu naší sekundární protilátky. Pro další imunolokalizační pokusy je tedy třeba otestovat jiné sekundární protilátky.

Protilátky proti ARPC3 a ARPC5 byly vytvořeny králíky imunizovanými proteiny z *Arabidopsis thaliana* exprimovanými v bakteriích *Escherichia coli*. Na imunoblotu s extrakty z *Arabidopsis thaliana* tyto protilátky nevykazovaly zřejmou reaktivitu proti cílovým proteinům, překvapivě však rozeznávaly odpovídající proteiny v extraktech z rostlin *Nicotiana benthamiana*. Tyto výsledky mohou naznačovat, že podjednotky komplexu ARP2/3 exprimované v *Arabidopsis thaliana* podléhají posttranslačním modifikacím, které brání jejich rozeznání protilátkami. Proto by při přípravě nových protilátek bylo vhodné imunizovat králíky proteiny extrahovanými přímo z rostlin *Arabidopsis thaliana* a ne z bakterií.

Z důvodu nespecifické interakce protilátek s danými proteiny na Western blotu nebyly s těmito protilátkami prováděny další imunofluorescenční vizualizace.

6 Souhrn

Původním cílem práce bylo vytvořit translační fúze všech podjednotek komplexu ARP2/3 s GFP a transformovat je do rostlin *Arabidopsis thaliana* mutantních v odpovídající podjednotce. Nakonec se kvůli problémům s transformací podařilo toto splnit pouze se dvěma podjednotkami a tak vznikly linie *arpc2:GFP-AtARPC2* a *arpc5:GFP-AtARPC5*. Podle publikovaných prací se však i tak jedná o dosud nejrozsáhlejší kolekci podjednotek komplexu ARP2/3 značených GFP v rostlinách *Arabidopsis thaliana*. Přitom již před deseti lety Szymanski (2005) poukazoval na nutnost vytvořit *in vivo* fluorescenční proby pro podjednotky komplexu ARP2/3 pro další výzkum jeho funkce. V nedávné době jeho tým publikoval vůbec první práci studující lokalizaci jedné podjednotky (ARPC5) fúzované s GFP v živých rostlinách *Arabidopsis thaliana* a autoři studovali její lokalizaci pouze v buňkách trichomů (Yanagisawa et al., 2015). Tato diplomová práce přináší nové informace, které mohou přispět k pochopení funkce komplexu ARP2/3 v rostlinných buňkách.

Fúzní proteiny GFP-*AtARPC2* a GFP-*AtARPC5* komplementovaly po transformaci do mutantů *arpc2* a *arpc5* mutantní fenotyp deformovaných trichomů, což naznačuje, že jsou schopné fungovat v komplexu s ostatními podjednotkami komplexu ARP2/3. Stejný efekt měla i tabáková podjednotka iGFP-*NtARPC2* exprimovaná pod promotorem indukovaným β -estradiolem. Testované podjednotky měly v buňkách shodnou lokalizaci do cytoplasmy a jádra a vytvářely motilní tečky, pohybující se podél aktinového cytoskeletu, které jsme pojmenovali arposomy. Tabáková podjednotka ARPC2 v některých případech při silné expresi značila mikrotubulární cytoskelet.

Při kolokalizačních experimentech s různými organelami bylo prokázáno, že arposomy výhradně a specificky kolokalizují se subpopulací peroxisomů. Protože komplementace fenotypu mutantních rostlin naznačuje, že fluorescenční fúze těchto podjednotek neměla zásadní vliv na jejich fyziologickou roli, a vzhledem k faktu, že stejný vzor vytváří dvě testované podjednotky, se lze domnívat, že se nejedná o artefakt, ale o skutečnou fyziologickou lokalizaci komplexu ARP2/3.

Dosud není jasné, jaká je souvislost mezi komplexem ARP2/3 a peroxisomy, ale je možné, že hraje nějakou roli v pohyblivosti, biogenezi, dělení, morfogenezi či degradaci peroxisomů.

7 Literatura

- Alonso, J.M. et al.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–657.
- Amann, K.J. and Pollard, T.D.** (2001). The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat. Cell Biol.* **3**: 306–310.
- Amos, L.A.** (2004). Microtubule structure and its stabilisation. *Org. Biomol. Chem.* **2**: 2153–60.
- Avisar, D., Prokhnevsky, A.I., Makarova, K.S., Koonin, E. V, and Dolja, V. V** (2008). Myosin XI-K Is required for rapid trafficking of Golgi stacks, peroxisomes, and mitochondria in leaf cells of *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* **146**: 1098–1108.
- Basu, D., El-Assal, S.E.-D., Le, J., Mallery, E.L., and Szymanski, D.B.** (2004). Interchangeable functions of *Arabidopsis* PIROGI and the human WAVE complex subunit SRA1 during leaf epidermal development. *Development* **131**: 4345–55.
- Basu, D., Le, J., El-Essal, S.E.-D., Huang, S., Zhang, C., Mallery, E.L., Koliantz, G., Staiger, C.J., and Szymanski, D.B.** (2005). DISTORTED3/SCAR2 is a putative *arabidopsis* WAVE complex subunit that activates the Arp2/3 complex and is required for epidermal morphogenesis. *Plant Cell* **17**: 502–24.
- Bear, J.E., Rawlas, John, F., and Saxe III., Charles, L.** (1998). SCAR, a WASP-related Protein, Isolated as a Suppressor of Receptor Defects in Late Dictyostelium Development. *J. Cell Biol.* **142**: 1325–1335.
- Bibikova, T.N., Blancaflor, E.B., and Gilroy, S.** (1999). Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **17**: 657–665.
- Boldogh, I., Yang, H., Nowakowski, W., Karmon, S., Hays, L., Yates, J., and Pon, L.** (2001). Arp2/3 complex and actin dynamics are required for actin-based mitochondrial motility in yeast. *Proc. ...* **98**: 3162–3167.
- Bringmann, M., Landrein, B., Schudoma, C., Hamant, O., Hauser, M.-T., and Persson, S.** (2012). Cracking the elusive alignment hypothesis: the microtubule-cellulose synthase nexus unraveled. *Trends Plant Sci.* **17**: 666–74.
- Cepińska, M.N., Veenhuis, M., van der Klei, I.J., and Nagotu, S.** (2011). Peroxisome fission is associated with reorganization of specific membrane proteins. *Traffic* **12**: 925–37.
- Degtyarev, M., Reichelt, M., and Lin, K.** (2014). Novel quantitative autophagy analysis by organelle flow cytometry after cell sonication. *PLoS One* **9**.
- Delano, W.** (2002). The PyMOL Molecular Graphics System.
- Dyachok, J., Shao, M.-R., Vaughn, K., Bowling, A., Facette, M., Djakovic, S., Clark, L., and Smith, L.** (2008). Plasma membrane-associated SCAR complex subunits promote cortical F-actin accumulation and normal growth characteristics in *Arabidopsis* roots. *Mol. Plant* **1**: 990–1006.
- Eitzen, G., Wang, L., Thorngren, N., and Wickner, W.** (2002). Remodeling of organelle-bound actin is required for yeast vacuole fusion. *J. Cell Biol.* **158**: 669–79.
- El-Assal, S.E.-D., Le, J., Basu, D., Mallery, E.L., and Szymanski, D.B.** (2004). *Arabidopsis* GNARLED encodes a NAP125 homolog that positively

- regulates ARP2/3. *Curr. Biol.* **14**: 1405–9.
- El-Din El-Assal, S., Le, J., Basu, D., Mallery, E.L., and Szymanski, D.B.** (2004). DISTORTED2 encodes an ARP2 subunit of the putative Arabidopsis ARP2/3 complex. *Plant J.* **38**: 526–38.
- Finka, A., Schaefer, D.G., Saidi, Y., Goloubinoff, P., and Zrýd, J.P.** (2007). In vivo visualization of F-actin structures during the development of the moss *Physcomitrella patens*. *New Phytol.* **174**: 63–76.
- Fišerová, J., Schwarzerová, K., Petrášek, J., and Opatrný, Z.** (2006). ARP2 and ARP3 are localized to sites of actin filament nucleation in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* **227**: 119–128.
- Frank, M.J.** (2003). Three Brick genes have distinct functions in a common pathway promoting polarized cell division and cell morphogenesis in the maize leaf epidermis. *Development* **130**: 753–762.
- Fucini, R. V., Chen, J.-L., Sharma, C., Kessels, M.M., and Stamnes, M.** (2002). Golgi vesicle proteins are linked to the assembly of an actin complex defined by mAbp1. *Mol. Biol. Cell* **13**: 621–31.
- Van Gestel, K., Slegers, H., Von Witsch, M., Samaj, J., Baluska, F., and Verbelen, J.-P.** (2003). Immunological evidence for the presence of plant homologues of the actin-related protein Arp3 in tobacco and maize: subcellular localization to actin-enriched pit fields and emerging root hairs. *Protoplasma* **222**: 45–52.
- Gruenheid, S. and Finlay, B.B.** (2003). Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature* **422**: 775–781.
- Harries, P.A., Pan, A., and Quatrano, R.S.** (2005). Actin-related protein2/3 complex component ARPC1 is required for proper cell morphogenesis and polarized cell growth in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* **17**: 2327–2339.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., and Mullineaux, P.M.** (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **42**: 819–832.
- Hetrick, B., Han, M.S., Helgeson, L.A., and Nolen, B.J.** (2013). Small molecules CK-666 and CK-869 inhibit actin-related protein 2/3 complex by blocking an activating conformational change. *Chem. Biol.* **20**: 701–12.
- Hölttä-Vuori, M., Alpy, F., Tanhuanpää, K., Jokitalo, E., Mutka, A.-L., and Ikonen, E.** (2005). MLN64 is involved in actin-mediated dynamics of late endocytic organelles. *Mol. Biol. Cell* **16**: 3873–86.
- Hu, J., Baker, A., Bartel, B., Linka, N., Mullen, R.T., Reumann, S., and Zolman, B.K.** (2012). Plant peroxisomes: biogenesis and function. *Plant Cell* **24**: 2279–303.
- Hülkamp, M., Miséra, S., and Jürgens, G.** (1994). Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell* **76**: 555–566.
- Hussey, P.J., Ketelaar, T., and Deeks, M.J.** (2006). Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 109–25.
- Chen, B.-C. et al.** (2014). Lattice light-sheet microscopy: Imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution. *Science* (80-.).
- Chowdhary, G., Kataya, A.R., Lingner, T., and Reumann, S.** (2012). Non-

- canonical peroxisome targeting signals: identification of novel PTS1 tripeptides and characterization of enhancer elements by computational permutation analysis. *BMC Plant Biol.* **12**: 142.
- Jedd, G. and Chua, N.** (2002). Visualization of peroxisomes in living plant cells reveals acto-myosin-dependent cytoplasmic streaming and peroxisome budding. *Plant Cell Physiol.* **43**: 384–392.
- Jiang, K., Sorefan, K., Deeks, M.J., Bevan, M.W., Hussey, P.J., and Hetherington, A.M.** (2012). The ARP2/3 complex mediates guard cell actin reorganization and stomatal movement in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**: 2031–40.
- Johnson, E., Seiradake, E., Jones, E.Y., Davis, I., Grünewald, K., and Kaufmann, R.** (2015). Correlative in-resin super-resolution and electron microscopy using standard fluorescent proteins. *Sci. Rep.* **5**: 9583.
- Kalil, K. and Dent, E.W.** (2014). Branch management: mechanisms of axon branching in the developing vertebrate CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**: 7–18.
- De Keijzer, J., Mulder, B.M., and Janson, M.E.** (2014). Microtubule networks for plant cell division. *Syst. Synth. Biol.* **8**: 187–94.
- Kelleher, J.F.** (1995). Sequences, structural models, and cellular localization of the actin-related proteins Arp2 and Arp3 from *Acanthamoeba*. *J. Cell Biol.* **131**: 385–397.
- Klahre, U. and Chua, N.H.** (1999). The Arabidopsis ACTIN-RELATED PROTEIN 2 (AtARP2) promoter directs expression in xylem precursor cells and pollen. *Plant Mol. Biol.* **41**: 65–73.
- Kollmar, M., Lbik, D., and Enge, S.** (2012). Evolution of the eukaryotic ARP2/3 activators of the WASP family: WASP, WAVE, WASH, and WHAMM, and the proposed new family members WAWH and WAML.rhodophyta. *BMC Res. Notes* **5**: 88.
- Komano, J., Miyauchi, K., Matsuda, Z., and Yamamoto, N.** (2004). Inhibiting the ARP2/3 Complex Limits Infection of Both Intracellular Mature Vaccinia Virus and Primate Lentiviruses. *Mol. Biol. Cell* **15**: 5197–5207.
- Komis, G., Mistrik, M., Šamajová, O., Ovečka, M., Bartek, J., and Šamaj, J.** (2015). Superresolution live imaging of plant cells using structured illumination microscopy. *Nat. Protoc.* **10**: 1248–1263.
- Korobova, F. and Svitkina, T.** (2008). Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuritogenesis in neuronal cells. *Mol. Biol. Cell* **19**: 1561–74.
- Kotchoni, S.O., Zakharova, T., Mallery, E.L., Le, J., El-Assal, S.E.-D., and Szymanski, D.B.** (2009). The association of the Arabidopsis actin-related protein2/3 complex with cell membranes is linked to its assembly status but not its activation. *Plant Physiol.* **151**: 2095–109.
- Kumagai, F.** (2001). Fate of Nascent Microtubules Organized at the M/G1 Interface, as Visualized by Synchronized Tobacco BY-2 Cells Stably Expressing GFP-Tubulin: Time-Sequence Observations of the Reorganization of Cortical Microtubules in Living Plant Cells. *Plant Cell Physiol.* **42**: 723–732.

- Kunda, P., Craig, G., Dominguez, V., and Baum, B.** (2003). Abi, Sra1, and Kette Control the Stability and Localization of SCAR/WAVE to Regulate the Formation of Actin-Based Protrusions. *Curr. Biol.* **13**: 1867–1875.
- Le, J., El-Assal, S.E.-D., Basu, D., Saad, M.E., and Szymanski, D.B.** (2003). Requirements for Arabidopsis ATARP2 and ATARP3 during Epidermal Development. *Curr. Biol.* **13**: 1341–1347.
- Le, J., Mallery, E.L., Zhang, C., Brankle, S., and Szymanski, D.B.** (2006). Arabidopsis BRICK1/HSPC300 Is an Essential WAVE-Complex Subunit that Selectively Stabilizes the Arp2/3 Activator SCAR2.
- Lee, Y.-R.J. and Liu, B.** (2004). Cytoskeletal motors in Arabidopsis. Sixty-one kinesins and seventeen myosins. *Plant Physiol.* **136**: 3877–83.
- Li, J.-F., Park, E., von Arnim, A.G., and Nebenführ, A.** (2009). The FAST technique: a simplified Agrobacterium-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of Arabidopsis and other plant species. *Plant Methods* **5**: 6.
- Li, S., Blanchoin, L., Yang, Z., and Lord, E.M.** (2003). The Putative Arabidopsis Arp2/3 Complex Controls Leaf Cell Morphogenesis. *Plant Physiol.* **132**: 2034–2044.
- Li, X., Li, J.-H., Wang, W., Chen, N.-Z., Ma, T.-S., Xi, Y.-N., Zhang, X.-L., Lin, H.-F., Bai, Y., Huang, S.-J., and Chen, Y.-L.** (2014). ARP2/3 complex-mediated actin dynamics is required for hydrogen peroxide-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant. Cell Environ.* **37**: 1548–60.
- Li, Y., Sorefan, K., Hemmann, G., and Bevan, M.W.** (2004). Arabidopsis NAP and PIR regulate actin-based cell morphogenesis and multiple developmental processes. *Plant Physiol.* **136**: 3616–27.
- Machesky, L.M., Atkinson, S.J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., and Pollard, T.D.** (1994). Purification of a Cortical Complex Containing 2 Unconventional Actins from *Acanthamoeba* by Affinity-Chromatography on Profilin-Agarose. *J. Cell Biol.* **127**: 107–115.
- Machesky, L.M. and Gould, K.L.** (1999). The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 117–121.
- Maisch, J., Fiserová, J., Fischer, L., and Nick, P.** (2009). Tobacco Arp3 is localized to actin-nucleating sites in vivo. *J. Exp. Bot.* **60**: 603–14.
- Mathur, J.** (2005). The ARP2/3 complex: giving plant cells a leading edge. *BioEssays* **27**: 377–87.
- Mathur, J., Mathur, N., and Hülskamp, M.** (2002). Simultaneous visualization of peroxisomes and cytoskeletal elements reveals actin and not microtubule-based peroxisome motility in plants. *Plant Physiol.* **128**: 1031–45.
- Mathur, J., Mathur, N., Kernebeck, B., and Hülskamp, M.** (2003a). Mutations in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**: 1632–45.
- Mathur, J., Mathur, N., Kirik, V., Kernebeck, B., Purushottam, B., and Hülskamp, M.** (2003b). Arabidopsis CROOKED encodes for the smallest subunit of the ARP2/3 complex and controls cell shape by region specific fine F-actin formation. *Development* **130**: 3137–3146.

- Mathur, J., Spielhofer, P., Kost, B., and Chua, N.** (1999). The actin cytoskeleton is required to elaborate and maintain spatial patterning during trichome cell morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **126**: 5559–5568.
- Mauricio, R.** (1998). Costs of resistance to natural enemies in field populations of the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *Am. Nat.* **151**: 20–28.
- Monshausen, G.B. and Gilroy, S.** (2009). Feeling green: mechanosensing in plants. *Trends Cell Biol.* **19**: 228–35.
- Mullins, R.D., Heuser, J. a, and Pollard, T.D.** (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 6181–6.
- Nebenführ, a, Gallagher, L. a, Dunahay, T.G., Frohlick, J. a, Mazurkiewicz, a M., Meehl, J.B., and Staehelin, L. a** (1999). Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiol.* **121**: 1127–1142.
- Nelson, B.K., Cai, X., and Nebenführ, A.** (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J.* **51**: 1126–1136.
- Oma, Y. and Harata, M.** (2011). Actin-related proteins localized in the nucleus. *Nucleus* **2**: 38–46.
- Perroud, P.-F. and Quatrano, R.S.** (2008). BRICK1 is required for apical cell growth in filaments of the moss *Physcomitrella patens* but not for gametophore morphology. *Plant Cell* **20**: 411–22.
- Perroud, P.-F. and Quatrano, R.S.** (2006). The role of ARPC4 in tip growth and alignment of the polar axis in filaments of *Physcomitrella patens*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **63**: 162–71.
- Pollard, T.** (2002). Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**: 768–774.
- Pollard, T.D.** (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**: 451–77.
- Pollard, T.D. and Borisov, G.G.** (2003). Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell* **112**: 453–465.
- Pollitt, A.Y. and Insall, R.H.** (2009). WASP and SCAR/WAVE proteins: the drivers of actin assembly. *J. Cell Sci.* **122**: 2575–2578.
- Rauhala, H.E., Teppo, S., Niemela, S., and Kallioniemi, A.** (2013). Silencing of the ARP2/3 Complex Disturbs Pancreatic Cancer Cell Migration. *Anticancer Res* **33**: 45–52.
- Reboulet, J.C., Kumar, P., and Kiss, J.Z.** (2010). DIS1 and DIS2 play a role in tropisms in *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Exp. Bot.* **67**: 474–478.
- Reggiori, F.** (2005). The Actin Cytoskeleton Is Required for Selective Types of Autophagy, but Not Nonspecific Autophagy, in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **16**: 5843–5856.
- Reumann, S., Buchwald, D., and Lingner, T.** (2012). PredPlantPTS1: A Web Server for the Prediction of Plant Peroxisomal Proteins. *Front. Plant Sci.* **3**: 194.
- Reumann, S., Ma, C., Lemke, S., and Babujee, L.** (2004). AraPeroX. A database of putative *Arabidopsis* proteins from plant peroxisomes. *Plant Physiol.* **136**: 2587–2608.

- Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T. a, Werb, Z., Sixt, M., and Wedlich-Soldner, R.** (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* **5**: 605–607.
- Robinson, R.C., Turbedsky, K., Kaiser, D.A., Marchand, J.B., Higgs, H.N., Choe, S., and Pollard, T.D.** (2001). Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* **294**: 1679–84.
- Rotty, J.D., Wu, C., and Bear, J.E.** (2013). New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**: 7–12.
- Rouiller, I., Xu, X.-P., Amann, K.J., Egile, C., Nickell, S., Nicastro, D., Li, R., Pollard, T.D., Volkman, N., and Hanein, D.** (2008). The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* **180**: 887–95.
- Saedler, R., Jakoby, M., Marin, B., Galiana-Jaime, E., and Hülskamp, M.** (2009). The cell morphogenesis gene SPIRRIG in Arabidopsis encodes a WD/BEACH domain protein. *Plant J.* **59**: 612–21.
- Sambade, A., Findlay, K., Schäffner, A.R., Lloyd, C.W., and Buschmann, H.** (2014). Actin-Dependent and -Independent Functions of Cortical Microtubules in the Differentiation of Arabidopsis Leaf Trichomes. *Plant Cell*.
- Sawa, M.** (2003). Essential role of the C. elegans Arp2/3 complex in cell migration during ventral enclosure. *J. Cell Sci.* **116**: 1505–1518.
- Semba, S., Iwaya, K., Matsubayashi, J., Serizawa, H., Kataba, H., Hirano, T., Kato, H., Matsuoka, T., and Mukai, K.** (2006). Coexpression of actin-related protein 2 and Wiskott-Aldrich syndrome family verproline-homologous protein 2 in adenocarcinoma of the lung. *Clin. Cancer Res.* **12**: 2449–54.
- Shibata, M., Oikawa, K., Yoshimoto, K., Kondo, M., Mano, S., Yamada, K., Hayashi, M., Sakamoto, W., Ohsumi, Y., and Nishimura, M.** (2013). Highly oxidized peroxisomes are selectively degraded via autophagy in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 4967–83.
- Shimmen, T. and Yokota, E.** (2004). Cytoplasmic streaming in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**: 68–72.
- Schindelin, J. et al.** (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**: 676–82.
- Schwab, B., Mathur, J., Saedler, R., Schwarz, H., Frey, B., Scheidegger, C., and Hülskamp, M.** (2003). Regulation of cell expansion by the DISTORTED genes in Arabidopsis thaliana: actin controls the spatial organization of microtubules. *Mol. Genet. genomics* **269**: 350–60.
- Smith, J.J. and Aitchison, J.D.** (2013). Peroxisomes take shape. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**: 803–17.
- Sparkes, I. a** (2010). Motoring around the plant cell: insights from plant myosins. *Biochem. Soc. Trans.* **38**: 833–838.
- Staiger, C.J. and Blanchoin, L.** (2006). Actin dynamics: old friends with new stories. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 554–62.
- Stevenson, V., Hudson, A., Cooley, L., and Theurkauf, W.E.** (2002). Arp2/3-Dependent Pseudocleavage Furrow Assembly in Syncytial Drosophila Embryos. *Curr. Biol.* **12**: 705–711.
- Straub, F.B. and Feuer, G.** (1950). Adenosinetriphosphate the functional

- group of actin. *Biochim. Biophys. Acta* **4**: 455–470.
- Suetsugu, S. and Takenawa, T.** (2003). Translocation of N-WASP by nuclear localization and export signals into the nucleus modulates expression of HSP90. *J. Biol. Chem.* **278**: 42515–23.
- Svitkina, T.M.** (1999). Arp2/3 Complex and Actin Depolymerizing Factor/Cofilin in Dendritic Organization and Treadmilling of Actin Filament Array in Lamellipodia. *J. Cell Biol.* **145**: 1009–1026.
- Szymanski, D.B.** (2005). Breaking the WAVE complex: the point of Arabidopsis trichomes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 103–12.
- Šlajcherová, K.** (2013). Lokalizace proteinu ARPC2 v rostlinné buňce.
- Valiathan, R.R. and Weisman, L.S.** (2008). Pushing for answers: Is myosin V directly involved in moving mitochondria? *J. Cell Biol.* **181**: 15–18.
- Vartiainen, M.K. and Machesky, L.M.** (2004). The WASP-Arp2/3 pathway: Genetic insights. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**: 174–181.
- Vidali, L., McKenna, S.T., and Hepler, P.K.** (2001). Actin Polymerization Is Essential for Pollen Tube Growth. *Mol. Biol. Cell* **12**: 2534–2545.
- Voigt, B., Timmers, A.C.J., Samaj, J., Müller, J., Baluska, F., and Menzel, D.** (2005). GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of Arabidopsis seedlings. *Eur. J. Cell Biol.* **84**: 595–608.
- Wang, R. and Brattain, M.G.** (2007). The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. *FEBS Lett.* **581**: 3164–70.
- Welch, M.D.** (1997). The Human Arp2/3 Complex Is Composed of Evolutionarily Conserved Subunits and Is Localized to Cellular Regions of Dynamic Actin Filament Assembly. *J. Cell Biol.* **138**: 375–384.
- Welch, M.D., Iwamatsu, a, and Mitchison, T.J.** (1997). Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* **385**: 265–9.
- Weston, L., Coutts, A.S., and La Thangue, N.B.** (2012). Actin nucleators in the nucleus: an emerging theme. *J. Cell Sci.* **125**: 3519–27.
- Winder, S.J. and Ayscough, K.R.** (2005). Actin-binding proteins. *J. Cell Sci.* **118**: 651–4.
- Winter, D.C., Choe, E.Y., and Li, R.** (1999). Genetic dissection of the budding yeast Arp2/3 complex: a comparison of the in vivo and structural roles of individual subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 7288–93.
- Wolffe, E.J., Weisberg, A.S., and Moss, B.** (1998). Role for the vaccinia virus A36R outer envelope protein in the formation of virus-tipped actin-containing microvilli and cell-to-cell virus spread. *Virology* **244**: 20–6.
- Yanagisawa, M., Desyatova, A.S., Belteton, S. a., Mallery, E.L., Turner, J. a., and Szymanski, D.B.** (2015). Patterning mechanisms of cytoskeletal and cell wall systems during leaf trichome morphogenesis. *Nat. Plants* **1**: 15014.
- Yarar, D., To, W., Abo, A., and Welch, M.D.** (1999). The Wiskott–Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* **9**: 555–S1.

- Yoshimoto, K., Shibata, M., Kondo, M., Oikawa, K., Sato, M., Toyooka, K., Shirasu, K., Nishimura, M., and Ohsumi, Y.** (2014). Organ-specific quality control of plant peroxisomes is mediated by autophagy. *J. Cell Sci.* **127**: 1161–8.
- Young, M.E., Cooper, J.A., and Bridgman, P.C.** (2004). Yeast actin patches are networks of branched actin filaments. *J. Cell Biol.* **166**: 629–35.
- Zhang, C., Kotchoni, S.O., Samuels, A.L., and Szymanski, D.B.** (2010). SPIKE1 signals originate from and assemble specialized domains of the endoplasmic reticulum. *Curr. Biol.* **20**: 2144–9.
- Zhang, C., Mallery, E.L., Schlueter, J., Huang, S., Fan, Y., Brankle, S., Staiger, C.J., and Szymanski, D.B.** (2008). Arabidopsis SCARs function interchangeably to meet actin-related protein 2/3 activation thresholds during morphogenesis. *Plant Cell* **20**: 995–1011.
- Zhang, C., Mallery, E.L., and Szymanski, D.B.** (2013). ARP2/3 localization in Arabidopsis leaf pavement cells: a diversity of intracellular pools and cytoskeletal interactions. *Front. Plant Sci.* **4**: 238.
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.-S., Niu, Q.-W., and Chua, N.-H.** (2006). Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. *Nat. Protoc.* **1**: 641–6.
- Zhang, X. and Hu, J.** (2010). The Arabidopsis chloroplast division protein DYNAMIN-RELATED PROTEIN5B also mediates peroxisome division. *Plant Cell* **22**: 431–442.
- Zigmond, S.H.** (2004). Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**: 99–105.
- Zicha, D., Allen, W.E., Brickell, P.M., Kinnon, C., Dunn, G.A., Jones, G.E., and Thrasher, A.J.** (1998). Chemotaxis of macrophages is abolished in the Wiskott-Aldrich syndrome. *Br. J. Haematol.* **101**: 659–665.